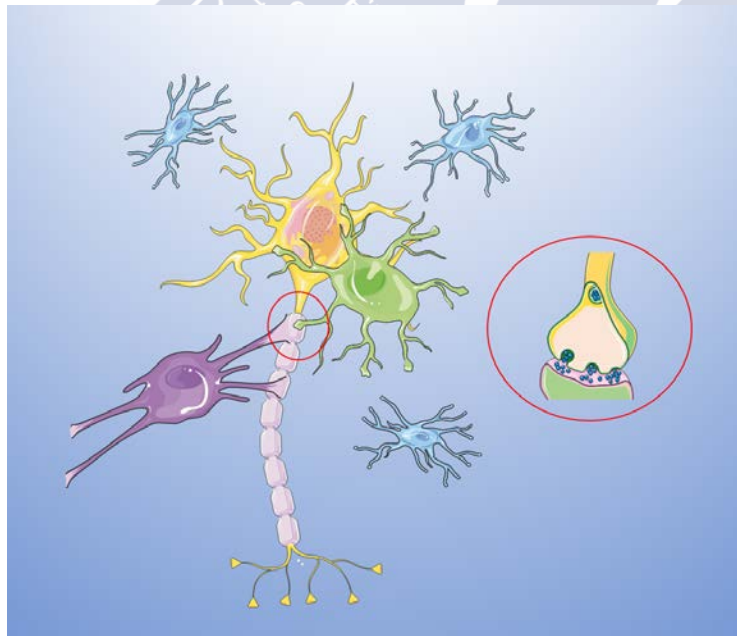


**NEUROTOXICIDAD MEDIADA POR
GLUTAMATO EN LA AGRESIÓN
HIPÓXICO-ISQUÉMICA PERINATAL**

TESIS DOCTORAL

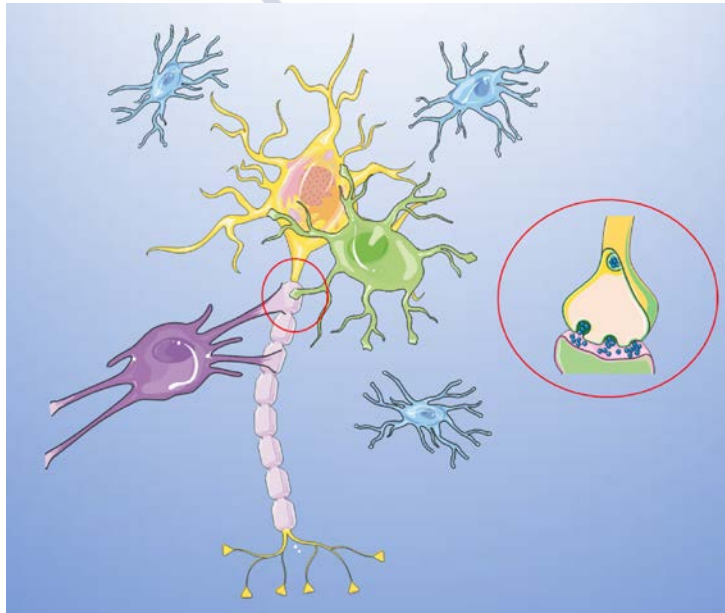


Alicia Iglesias Deus

2017



NEUROTOXICIDAD MEDIADA POR GLUTAMATO EN LA AGRESIÓN HIPÓXICO-ISQUÉMICA PERINATAL



**UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA
FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE PEDIATRÍA**

Alicia Iglesias Deus

Memoria del Trabajo de Investigación
Programa de Doctorado de Pediatría

2017





**UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA
FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE PEDIATRÍA**

TESIS DOCTORAL:

Neurotoxicidad mediada por glutamato en la agresión
hipóxico-isquémica perinatal

AUTOR:

Dña. Alicia IGLESIAS DEUS

DIRECTORES:

Prof. Dr. M^a Luz COUCE PICO

Profesor Asociado de Pediatría
Facultad de Medicina y Odontología. Universidad de Santiago de Compostela

Prof. Dr. M^a Rosaura LEIS TRABAZO

Profesor Titular de Pediatría
Facultad de Medicina y Odontología. Universidad de Santiago de Compostela

Prof. Dr. José María FRAGA BERMÚDEZ

Catedrático de Pediatría
Facultad de Medicina y Odontología. Universidad de Santiago de Compostela

Prof. Dr. José Antonio CASTILLO SÁNCHEZ

Catedrático de Neurología.
Facultad de Medicina y Odontología. Universidad de Santiago de Compostela





Universidad de Santiago de Compostela
Facultad de Medicina y Odontología
Departamento de Pediatría

MARÍA LUZ COUCE PICO, MARÍA ROSAURA LEIS TRABAZO, JOSÉ MARÍA FRAGA BERMÚDEZ Y JOSÉ ANTONIO CASTILLO SÁNCHEZ, PROFESORA ASOCIADA DE PEDIATRÍA, PROFESORA TITULAR DE PEDIATRÍA, CATEDRÁTICO DE PEDIATRÍA Y CATEDRÁTICO DE NEUROLOGÍA RESPECTIVAMENTE DE LA FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA.

CERTIFICAN:

Que la presente tesis titulada “NEUROTOXICIDAD MEDIADA POR GLUTAMATO EN LA AGRESIÓN HIPÓXICO-ISQUÉMICA PERINATAL”, ha sido elaborada por **Dña. ALICIA IGLESIAS DEUS** con la tutorización, colaboración y dirección de los abajo firmantes. Este trabajo reúne todos los requisitos pertinentes para su presentación y lectura, a fin de optar al grado de Doctor por la Universidad de Santiago de Compostela.

Y para que así conste, firmamos el presente en Santiago de Compostela a 28 de marzo de 2017.

M^a Luz Couce Pico

M^a Rosaura Leis Trabazo

José María Fraga Bermúdez

José Antonio Castillo Sánchez





Universidad de Santiago de Compostela
Facultad de Medicina y Odontología
Departamento de Pediatría

Dña. ALICIA IGLESIAS DEUS con D.N.I. 44845832-H, licenciada en Medicina y Cirugía por la Universidad de Santiago de Compostela.

DECLARA:

Ser la autora de la presente tesis titulada “NEUROTOXICIDAD MEDIADA POR GLUTAMATO EN LA AGRESIÓN HIPÓXICO-ISQUÉMICA PERINATAL”, dirigida por los Profs. Dres. Dña. María Luz Couce Pico, Dña. María Rosaura Leis Trabazo, D. José María Fraga Bermúdez y D. José Antonio Castillo Sánchez y que es presentada para optar al grado de Doctor por la Universidad de Santiago de Compostela.

Y para que así conste, firmo el presente en Santiago a 28 de marzo de 2017.

Doctoranda:

Alicia Iglesias Deus



AGRADECIMIENTOS

Después de estos años, de horas y horas dedicadas a este trabajo, son tres fundamentalmente los sentimientos que me afloran, por un lado el de alivio y conformidad ante el logro conseguido y por el otro, el de agradecimiento a todas las personas que con su apoyo han contribuido a que este trabajo fuese adelante.

Para empezar, quisiera agradecer al tutor y a los directores sus buenas recomendaciones y directrices en cada uno de los puntos necesarios para el adecuado proseguir de esta tesis. Mi agradecimiento infinito para Mari Luz, por su dedicación y persistencia, con una energía que traspasa a cuantos le rodeamos y que hace que cualquier reto sea alcanzable por muy difícil que sea.

A todo el equipo del Laboratorio de Investigación en Neurociencias Clínicas del Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela (IDIS) por todas las facilidades que me brindaron para el análisis de las muestras, y especialmente, al Dr. Francisco Campos por su continua disponibilidad, accesibilidad y dedicación, convirtiéndose en un guía esencial en este largo recorrido.

A Iria que si no fuese por sus cálculos estadísticos, a día de hoy seguiría inmersa en los números.

A mis compañeros del Servicio de Neonatos, Olalla, Bati, Alejandro, Adela, Ana y M^a José, por su acompañamiento diario, sus siempre buenos consejos y apoyo en los momentos de flaqueza.

A mis amigos, de forma especial a Conchi, y a mi familia, mi padre, mis hermanos Eva, Alberto y Gonzalo, mis cuñados Óscar y Rocío y por supuesto, a mi marido Carlos, por haber estado siempre a mi lado, respetando mi continua ocupación y aprovechando los escasos momentos libres para apoyarme y darme fuerzas para seguir.

Por último, esta tesis va dedicada a mi madre, pues representa lo que ella nos inculcó desde pequeños, que con trabajo poco a poco todo se consigue y que ayudar a los demás nos hace mejores personas y más felices. Para ti, sí que no existen suficientes palabras de agradecimiento.





ÍNDICE



ÍNDICE

RESUMEN	1
I. INTRODUCCIÓN	5
I.1. DEFINICIONES	7
I.2. REPERCUSIÓN A NIVEL MUNDIAL DE LA ASFIXIA PERINATAL	9
I.3. FISIOPATOLOGÍA	10
I.3.1. Neurotoxicidad mediada por glutamato	16
I.4. MANIFESTACIONES CLÍNICAS	21
I.4.1. Clínica neurológica. Escalas de gravedad	21
I.4.2. Clínica sistémica. Enfermedad hipóxico-isquémica	26
I.5. ESTUDIOS COMPLEMENTARIOS	27
I.5.1. Pruebas electroencefalográficas	28
I.5.1.1. EEG	28
I.5.1.2. EEGa	29
I.5.2. Pruebas de neuroimagen	32
I.5.2.1. Ecografía cerebral	32
I.5.2.2. RM cerebral	35
I.5.2.3. Tomografía de emisión de positrones	39
I.5.3. Biomarcadores	41
I.5.3.1. Biomarcadores de daño neurológico	41
I.5.3.2. Biomarcadores de daño sistémico	43
I.5.4. Saturación regional de oxígeno	46
I.6. MANEJO TERAPÉUTICO	47
I.6.1. Tratamiento de soporte general	47
I.6.2. Hipotermia terapéutica	48
I.7. PRONÓSTICO Y FACTORES PRONÓSTICOS	51
I.7.1. Clínica	52
I.7.2. EEGa	54
I.7.3. Neuroimagen	56

I.7.4.	Biomarcadores de daño neurológico.....	58
I.7.5.	Biomarcadores de daño sistémico.....	60
I.7.6.	Saturación regional de oxígeno cerebral y sistémica.....	60
I.7.7.	Otros factores pronósticos y resumen	61
I.8.	EVALUACIÓN Y SEGUIMIENTO A LARGO PLAZO	63
I.8.1.	Parálisis cerebral	66
II.	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	69
II.1.	HIPÓTESIS	71
II.2.	OBJETIVOS.....	71
III.	MATERIAL Y MÉTODOS	73
III.1.	DISEÑO DEL ESTUDIO	75
III.2.	PACIENTES	76
III.3.	MÉTODO ANALÍTICO Y CLÍNICO.....	77
III.4.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	81
IV.	RESULTADOS	83
IV.1.	CARACTERÍSTICAS DE LOS GRUPOS DE ESTUDIO	85
IV.1.1.	Casos	85
IV.1.2.	Controles	92
IV.2.	ACTUACIÓN SOBRE LOS GRUPOS DE ESTUDIO.....	96
IV.2.1.	Actuación sobre el grupo de casos	96
IV.2.2.	Actuación sobre el grupo de controles	100
IV.3.	DESCRIPTIVA CASOS-CONTROLES	100
IV.4.	COMPARACIÓN DEL pH vs OTRAS VARIABLES DE ESTUDIO.....	105
IV.5.	COMPARACIÓN DEL LACTATO vs OTRAS VARIABLES DE ESTUDIO.....	108
IV.6.	ANÁLISIS DE GLUTAMATO, GOT, GPT, GGT Y CK.....	111
IV.6.1.	Comparación entre casos y controles.....	111

IV.6.2. Glutamato vs otras variables de estudio.....	113
IV.6.3. GOT vs otras variables de estudio	115
IV.6.4. GPT vs otras variables de estudio	119
IV.6.5. GGT vs otras variables de estudio	120
IV.6.6. CK vs otras variables de estudio	121
IV.7. COMPARACIÓN DEL APGAR5 VS OTRAS VARIABLES DE ESTUDIO.....	122
IV.8. ANÁLISIS MULTIVARIANTE.....	124
IV.8.1. Análisis multivariante para acidosis perinatal	124
IV.8.2. Análisis multivariante para glutamato sérico.....	125
IV.9. COMPARACIÓN DEL pH Y LAS CONCENTRACIONES DE GLUTAMATO Y GOT DENTRO DEL GRUPO DE CASOS.....	125
IV.10. RESULTADOS EN TÉRMINOS DE MORTALIDAD Y NEURODESARROLLO	126
V. DISCUSIÓN	129
VI. CONCLUSIONES	159
VII. LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN Y PROYECTOS FUTUROS	163
VIII. ANEXOS	167
IX. ÍNDICE DE TABLAS	175
X. ÍNDICE DE FIGURAS	179
XI. ABREVIATURAS	185
XII. BIBLIOGRAFÍA.....	191
XIII. PUBLICACIONES	229





RESUMEN



El objetivo de esta tesis doctoral es valorar el metabolismo del glutamato en neonatos que presentan acidosis perinatal con pH de riesgo de resultados neurológicos adversos ($\text{pH} \leq 7,1$), determinar el papel que la transaminasa glutámico-oxalacética (GOT), principal enzima limpiadora de glutamato, tiene en relación al glutamato en la acidosis perinatal, y la relación entre la acidosis de riesgo y los resultados neurológicos a corto y a largo plazo, con el fin de aumentar el conocimiento de la neurotoxicidad mediada por el glutamato y asentar las bases para el desarrollo de nuevas armas terapéuticas.

Se llevó a cabo un estudio prospectivo de casos y controles en 43 neonatos nacidos en nuestro hospital, reclutados en función de la presencia (casos) o ausencia (controles) de acidosis con $\text{pH} \leq 7,1$ al nacimiento en sangre arterial de cordón. En todos los niños se midieron las concentraciones de glutamato, transaminasas GOT, transaminasa glutámico-pirúvica (GPT) y gamma glutamil transpeptidasa (GGT), y creatin kinasa (CK). Se realizó una evaluación neurológica sistematizada mediante la escala de García-Alix, pruebas de neuroimagen y de electroencefalografía, evaluación extraneurológica y evaluación neurocognitiva a los 24 meses de vida mediante la escala de desarrollo Infantil Bayley III.

En los casos, las concentraciones de glutamato ($151,32$ vs $63,62$ $\mu\text{mol/L}$; $P=5.54\text{e-}05$) y GOT ($83,34$ vs $34,77$ UI/L ; $P=0.00016$) fueron más elevadas que en los controles, existiendo una correlación negativa de los niveles de glutamato con el pH ($r=0.352$; $P=0.026$) y con el Apgar a los 5 minutos de vida (Apgar5) ($r=0.392$; $P=0.007$), y entre los niveles de GOT con el pH ($r=0.464$; $P=0.0036$) y con el Apgar5 ($r=0.579$; $P=1.34\text{e-}4$). Los valores de glutamato y GOT se correlacionaron positivamente ($r=0.403$; $P=0.006$). No hubo diferencias en las concentraciones de GPT, GGT y CK entre los dos grupos ni tampoco relación entre la GPT/GGT/CK y el glutamato. Desde un punto de vista clínico, un 21,7% de los casos presentó Encefalopatía hipóxico-isquémica (EHI) y un 26,1% compromiso sistémico, siendo el riñón el órgano más frecuentemente afectado y la mortalidad en acidosis fue del 4,3%. Ninguno de los controles presentó compromiso neurológico ni sistémico. En la evaluación neurocognitiva a los 24 meses de vida, no se hallaron diferencias entre casos y controles en las puntuaciones medias de cada uno de los 3 dominios analizados por la escala Bayley III. Dentro de los casos, un 9,1% presentaron un trastorno aislado del lenguaje y el 50% de los niños con EHI moderada-grave tuvieron un buen pronóstico valorado en términos de mortalidad y

desarrollo. Dentro del grupo de controles, un 9,5% tuvieron un retraso global del desarrollo.

En conclusión, la acidosis con $\text{pH} \leq 7,1$ es un factor de riesgo mayor para EHI y mortalidad precoz, pero no se puede asegurar un resultado adverso solamente por la valoración aislada del pH. En este contexto, el organismo tiene un mecanismo endógeno de defensa a través de la acción de la GOT que en condiciones de hipoxia-isquemia aumenta para metabolizar el exceso de glutamato y así, limitar el daño. Dado que en estas condiciones también puede producirse daño de otros órganos, nosotros hemos analizado los valores de GPT, GGT y CK y no hemos visto diferencias en sus concentraciones entre el grupo de casos y controles, descartándose que las elevaciones de GOT de nuestros casos se deban a afectación hepática hipóxica o daño muscular. Estos conocimientos abren la puerta al uso potencial de la GOT como diana terapéutica en la asfixia perinatal, pero todavía se necesitan más estudios que evalúen su papel en este sentido.





I. INTRODUCCIÓN



I.1. DEFINICIONES

La **Encefalopatía Neonatal (EN)** es un síndrome clínico presente al nacimiento caracterizado por la dificultad para iniciar o mantener la respiración (depresión respiratoria), nivel de conciencia alterado (dificultad para despertar o mantener la vigilia), alteración del tono muscular y de las respuestas motoras, de la reactividad y de los reflejos, de la capacidad de alimentación y, con frecuencia, convulsiones. Cuando la EN es de origen hipóxico-isquémico se habla de **Encefalopatía hipóxico-isquémica (EHI) o asfixia perinatal**, definida por la alteración producida al feto o al recién nacido (RN) alrededor del momento del nacimiento en relación con una interrupción del intercambio gaseoso por hipoxemia (por la falta de oxígeno o disminución de la cantidad de oxígeno de la sangre) y/o por isquemia (perfusión tisular inadecuada). Esta condición conduce a una hipoxemia e hipercapnia con acidosis metabólica e hiperlactacidemia.

La existencia de un **evento hipóxico-isquémico o agresión hipóxico-isquémica** es una situación de riesgo en donde la perfusión y oxigenación de los tejidos pueden verse comprometidos y dar lugar al daño neurológico (**Encefalopatía hipóxico-isquémica**) y/o de otros órganos (**Enfermedad hipóxico-isquémica**). En este contexto, es crucial reconocer una serie de indicadores que señalan la posible existencia de una asfixia periparto y objetivar el estado de afectación fetal. Existen **factores anteparto** (condiciones maternas como hipertensión crónica, enfermedad tiroidea, depresión, enfermedad autoinmune; historia obstétrica como la paridad, gemelaridad, tratamientos de fertilidad, la edad gestacional <37 y >41 semanas, el bajo peso fetal; complicaciones durante la gestación como hipertensión, infección respiratoria y del tracto urinario, colestasis, episodios de movimientos fetales reducidos) que pueden predisponer a los episodios adversos intraparto en las mujeres embarazadas o a incrementar la susceptibilidad fetal a la asfixia perinatal, pero por sí mismos los factores relacionados con la hipoxia-isquemia perinatal se presentan intraparto, de ahí la importancia de los cuidados de la embarazada y de la monitorización fetal intraparto¹. El *International Cerebral Palsy Task Force* en 1999², la *Academia Americana de Pediatría* en 1996³ y el *Colegio Americano de Obstetricia y Ginecología* en 2002⁴ definieron una serie de criterios esenciales en el diagnóstico de la anoxia intraparto y otros criterios que no

siendo esenciales apoyan el diagnóstico⁵ (Tabla 1).

Conferencia de consenso sobre el diagnóstico de la anoxia intraparto	
Criterios esenciales	International Cerebral Palsy Task Force (1999) <ul style="list-style-type: none"> - Acidosis metabólica (pH <7,0 y déficit de bases ≥ 12 mmol/L) - Encefalopatía neonatal precoz moderada o severa - Parálisis cerebral del tipo cuadriplejía espástica o discinética
	Academia Americana de Pediatría (1996) <ul style="list-style-type: none"> - Acidosis metabólica profunda (pH <7,0) - Score de Apgar ≤ 3 a los 5 minutos - Encefalopatía neonatal precoz - Afectación de múltiples órganos
	Colegio Americano de Obstetricia y Ginecología (2002) <ul style="list-style-type: none"> - Acidosis metabólica (pH <7,0 y déficit de bases ≥ 12 mmol/L) - Encefalopatía neonatal precoz moderada o severa - Parálisis cerebral del tipo cuadriplejía espástica o discinética - Exclusión de otras causas - Evento centinela - Cambio brusco del ritmo cardiaco fetal - Score de Apgar ≤ 3 a los 5 minutos - Afectación multisistémica en las primeras 72 horas - Imagen específica de resonancia magnética
Otros criterios	International Cerebral Palsy Task Force (1999) <ul style="list-style-type: none"> - Evento centinela - Cambio brusco del ritmo cardiaco fetal - Score de Apgar ≤ 6 a los 5 minutos - Afectación multisistémica - Imagen de resonancia magnética específica

Tabla 1: Conferencia de consenso sobre el diagnóstico de la anoxia intraparto.

De forma general, los **indicadores** que señalan riesgo de hipoxia-isquemia fetal son: un estado fetal no tranquilizador durante la monitorización, es decir, la sospecha de pérdida del bienestar fetal (SPBF), que puede reconocerse por alteración de la frecuencia cardiaca fetal, bradicardia mantenida, aparición de desaceleraciones tardías, líquido meconial y/o un pH patológico obtenido del cuero cabelludo del feto; la existencia de un evento hipóxico centinela (factores maternos como hipotensión, hipoxia severa; relacionados con el cordón umbilical como prolapso u oclusión, circular de cordón; factores placentarios como insuficiencia o desprendimiento y factores uterinos como ruptura, entre otros) y la existencia de una distocia de parto (distocia de hombros,

fracaso del parto instrumentalizado). El **estado objetivo de afectación perinatal** es definido por un pH en cuero cabelludo, de cordón o pH en la 1ª hora de vida $<7,0$ o un déficit de bases ≥ 12 mmol/L, un score de Apgar (*ver Anexo 1*) a los 5 minutos de vida (Apgar5) ≤ 5 y la necesidad de reanimación cardiopulmonar (RCP) avanzada con intubación y/o masaje cardíaco o ventilación con presión positiva intermitente (VPPI) durante más de 5 minutos. Hay autores que también incluyen una hiperlactacidemia $>7,5$ mmol/L⁶.

Así es que, para hablar de **agresión hipóxico-isquémica** debe objetivarse el estado de afectación fetal por el cumplimiento de al menos uno de los datos anteriores (pH $<7,0$ o Apgar5 ≤ 5 o reanimación avanzada con intubación y/o masaje cardíaco o VPPI durante más de 5 minutos). Para hablar de **EHI o asfixia perinatal** debe constatarse la afectación neurológica y de otros órganos, la existencia de una acidosis metabólica con pH $<7,0$ y Apgar5 <4 . Para justificar que la EN es de origen hipóxico-isquémico deben reconocerse los puntos anteriores y descartarse la presencia de otras causas de EN como son las enfermedades metabólicas, malformaciones congénitas severas, infecciones o anormalidades genéticas^{1,7,8}.

I.2. REPERCUSIÓN A NIVEL MUNDIAL DE LA ASFIXIA PERINATAL

La **EHI o asfixia perinatal** es una causa importante de daño neurológico en el RN y puede implicar consecuencias graves en términos de morbilidad tanto a corto como a largo plazo, pudiendo ocasionar la muerte o una discapacidad neurológica permanente. Es la principal causa en el mundo de muerte, morbilidad neurológica grave y convulsiones en el RN a término y es responsable de aproximadamente un 20% de los casos de parálisis cerebral en la niñez^{8,9}. La asfixia al nacimiento y su consecuencia, la EHI, tiene uno de los índices AVAD (años de vida ajustados por discapacidad) y AVAC (años de vida ajustados por calidad) más altos de todas las enfermedades, ya que un RN tiene toda su vida por delante. A pesar de los avances en la tecnología de monitoreo fetal y en los conocimientos adquiridos sobre la fisiopatología de las patologías fetales y neonatales, la EHI continua siendo una condición con grandes repercusiones a nivel

familiar y sociosanitario, con altos costos familiares y socioeconómicos.

La EHI afecta a 1-6 por cada 1000 nacidos vivos ≥ 36 semanas de edad gestacional en los países desarrollados y a 5-10 por 1000 nacidos vivos en los países en vías de desarrollo¹⁰, incidencia que aumenta en el caso de RN prematuros y con peso al nacimiento < 2500 g, alcanzando cifras del 60%, y del 90% en los RN muy prematuros < 28 semanas y de peso inferior a 1000 g¹¹. En nuestro entorno, se observa una tendencia al descenso en la incidencia, a diferencia de lo que ocurre en los países en vías de desarrollo en los que la incidencia se mantiene¹². Las tasas de incidencia (utilizando definiciones similares) entre 1975 y 1990 oscilaban entre 7,7 y 4,4‰ RN vivos, mientras que las referidas al final de la década de los 90 y comienzos del siglo XXI fueron siempre inferiores al 1,5‰¹³⁻¹⁹. Kurinczuk *et al* en su revisión de 2010, refieren una incidencia estimada de EN del 3,0‰ nacidos vivos y de EHI del 1,5‰ nacidos vivos²⁰. Se calcula que las formas moderadas o graves, que son las que conllevan un mayor riesgo de daño cerebral y discapacidad permanente, acontecen en nuestro entorno entre el 0,5-1,0‰ RN vivos^{21,22}, incidencia similar a la de otros países europeos.

La organización mundial de la salud (OMS) estimó que un 25% de los neonatos y un 8% de todas las muertes por debajo de los 5 años en países con pocos recursos habían presentado asfixia alrededor del nacimiento. En el año 2010, estimó que 1,15 millones de RN en el mundo presentaron EHI perinatal, de los cuales un 96% nacieron en países con renta per cápita baja o moderada. Del total de bebés, 287.000 fallecieron, y de los supervivientes, 414.000 presentaron alteración del neurodesarrollo: 233.000 (163.000-342.000) sobrevivieron con discapacidad moderada o grave y 181.000 (82.000-319.000) con discapacidad leve.

I.3. FISIOPATOLOGÍA

La principal fuente de energía del cerebro fetal y neonatal es la glucosa, la cual es aportada de forma continua desde los capilares sanguíneos hasta el citoplasma neuronal, en donde las moléculas de glucosa entran a la vía glucolítica para la generación de piruvato, acetil-CoA y finalmente nicotinamida adenina dinucleótido de hidrógeno (NADH), que es una fuente de electrones. Los electrones ingresan en la mitocondria

pasando a través de la cadena de enzimas del citocromo en la membrana interna mitocondrial y se genera adenosín trifosfato (ATP).

En condiciones fisiológicas, el pH cerebral extracelular es de 7,4 y el intracelular (citoplasmático) es más ácido, en torno a 7,2. La tendencia es a mantener un pH ácido intracelular gracias a dichas reacciones metabólicas que dan lugar a la producción de ATP, permitiendo un adecuado funcionamiento del intercambiador de Na^+/H^+ que es la proteína transportadora de membrana encargada de mantener este equilibrio en el pH. En la EHI la reducción del flujo sanguíneo cerebral y del aporte de oxígeno dan lugar a la depleción de las fuentes de ATP, con generación de metabolismo anaerobio y acumulación de lactato y piruvato. La acidificación resultante produce disfunción de las bombas iónicas con hiperactivación del intercambiador de Na^+/H^+ y de la ATPasa Na^+/K^+ permitiendo el paso de Na^+ al interior celular y la salida de H^+ y K^+ generándose un pH alcalino intracelular y favoreciéndose por la apertura de los canales de Ca^{++} , la entrada de calcio al interior celular. Este paso de Ca^{++} desencadena la cascada neurotóxica y da lugar a la activación de proteasas, fosfolipasas y formación de radicales libres de oxígeno y nitrógeno, que alteran la excitabilidad de la membrana y la contractilidad, generando radicales libres tóxicos, liberación y acumulación de aminoácidos excitotóxicos, hipertrofia celular, apoptosis y necrosis. Así es que, en las situaciones de hipoxia-isquemia el pH intracelular cerebral se vuelve alcalino, lo cual se asocia con la gravedad de las alteraciones (un pH intracelular persistentemente alcalino se ha asociado con atrofia cerebral, “la paradoja del pH”) y con el desarrollo de convulsiones²³. En una fase precoz (primeros 15-20 minutos), se produce óxido nítrico (NO) por acción de la óxido nítrico sintetasa endotelial, con un papel importante en la autorregulación celular. Pero en fases avanzadas (a partir de las 6 horas), el aumento de calcio intracelular produce una activación de las enzimas óxido nítrico sintetasa inducible y neuronal, generándose masivamente NO que altera el funcionamiento mitocondrial y genera peroxinitrito (ONOO^-). El ONOO^- produce oxidación o nitrosilación de las proteínas mitocondriales con la depresión respiratoria y disminución de la capacidad de neutralizar radicales libres de oxígeno consiguientes con disminución de antioxidantes endógenos como el glutatión y también es un potente oxidante, incluso en presencia de agentes antioxidantes. Se produce invasión de células pro-inflamatorias desde la microcirculación cerebral, se liberan citoquinas pro-inflamatorias como interleuquina (IL) 1β , IL 6 y 8, factor de necrosis tumoral (TNF) y activación del factor

de transcripción nuclear kappa B y lípidos bioactivos como los derivados del ácido araquidónico (leucotrienos y tromboxanos), prostaglandinas (PG) y factor activador plaquetario (FAP) (*Figura 1*).

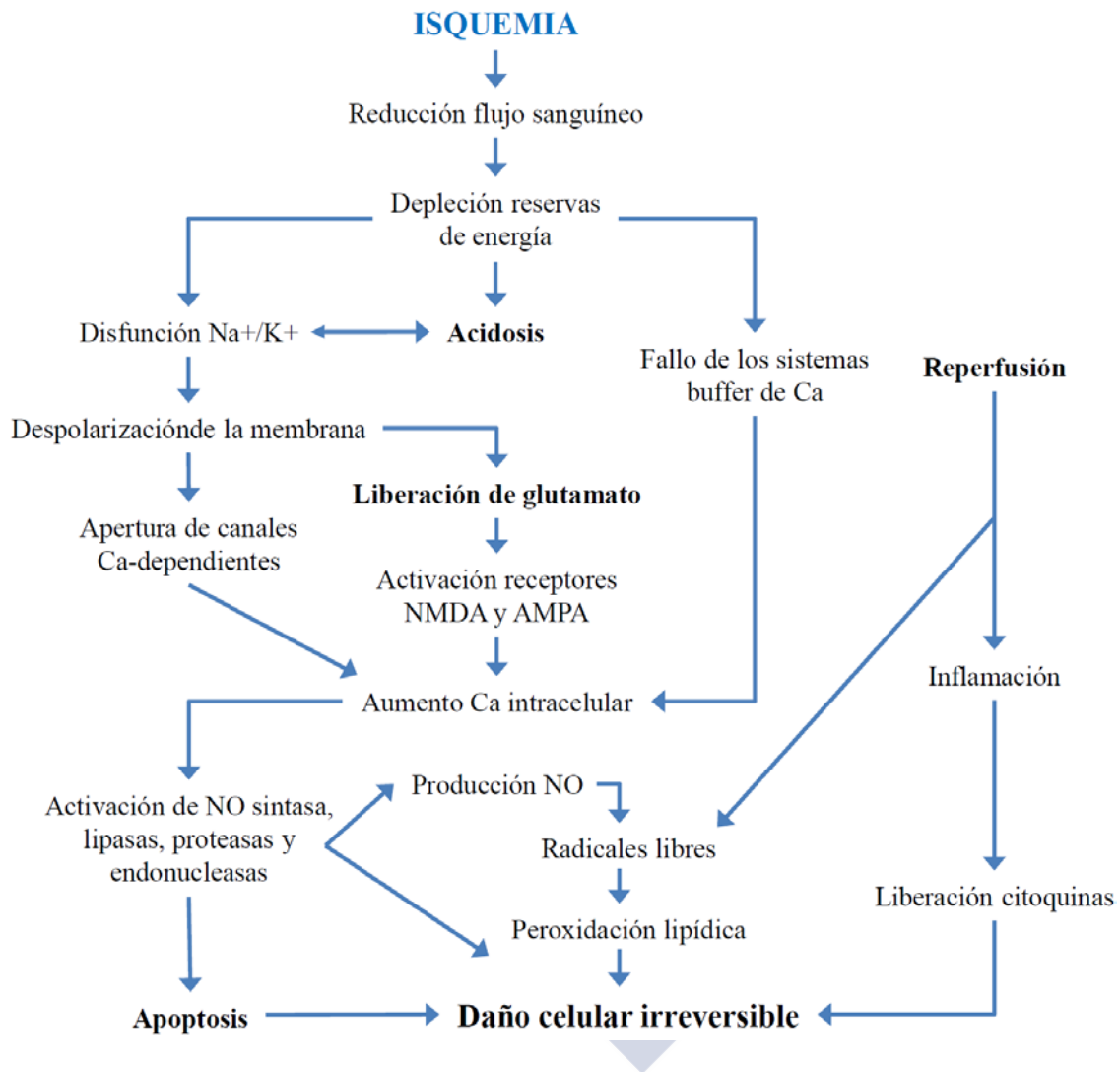


Figura 1: Fisiopatología en hipoxia-isquemia.

(NO: Óxido nítrico; NMDA: N-metil-D-aspartato; AMPA: Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico)

Se describen diferentes fases en la génesis de la lesión cerebral anóxica²⁴⁻²⁶ (*Figura 2*):

- **Fallo energético primario:** Está determinado por la severidad del insulto hipóxico-isquémico y relacionado con la disminución del aporte energético, la alteración de las bombas iónicas permitiendo la entrada de agua y sodio al interior celular, generándose edema y la acumulación de calcio y

neurotransmisores, responsables de una muerte neuronal precoz. La actividad eléctrica de la corteza es rápidamente inhibida, manteniéndose las funciones en el tronco cerebral. La duración de esta fase es variable dependiendo de la intensidad de la lesión inicial. De hecho, el parto inmediato acompañado de una reanimación efectiva del neonato puede detener la progresión de la lesión cerebral neonatal.

- **Fallo energético secundario:** Relacionado con el fenómeno de la reperfusión y con el deterioro del metabolismo oxidativo cerebral a las 6-24 horas tras la agresión hipóxico-isquémica. Se produce una disminución progresiva de los niveles de ATP debido a la alteración de la fosforilación oxidativa mitocondrial. Los electrones se acumulan en la cadena de enzimas del citocromo y los niveles de lactato intracelular aumentan. Existe una mayor elevación del lactato en el tálamo y los núcleos de la base, probablemente por la mayor demanda metabólica de estas zonas. Se producen y se incrementan los niveles de radicales libres y de NO, disfunción microvascular, acumulación de polimorfonucleares y otras células pro-inflamatorias, adhesión plaquetaria, liberación de citoquinas pro-inflamatorias, activación de la microglía y de la excitotoxicidad glutamatérgica. Este proceso continúa inexorablemente aunque exista un aporte constante de oxígeno y glucosa al cerebro, originándose una muerte celular retardada. Paralelamente al desarrollo de este fallo energético secundario, aparece la actividad eléctrica paroxística y la generación de convulsiones. Esto es secundario a la excesiva liberación de neurotransmisores excitatorios, como glutamato y aspartato, desde la hendidura presináptica y a la despolarización de la membrana celular.
- Entre ambos fallos energéticos existe una **fase latente** en donde tras el primer deterioro del metabolismo oxidativo que conlleva la agresión hipóxico-isquémica aguda cuya duración suele ser de 30-60 minutos, se produce una aparente recuperación del metabolismo oxidativo cerebral, inhibiéndose la cascada neurotóxica. Esta fase dura de 1 a 6-24 horas, convirtiéndose en una verdadera ventana terapéutica y así evitar el fallo energético secundario.
- Tras el fallo energético secundario, se habla de una **fase terciaria** que puede

durar de semanas a años y que está determinada por la persistencia de la alcalosis láctica cerebral. Se caracteriza por gliosis, activación persistente del receptor inflamatorio y cambios epigenéticos.

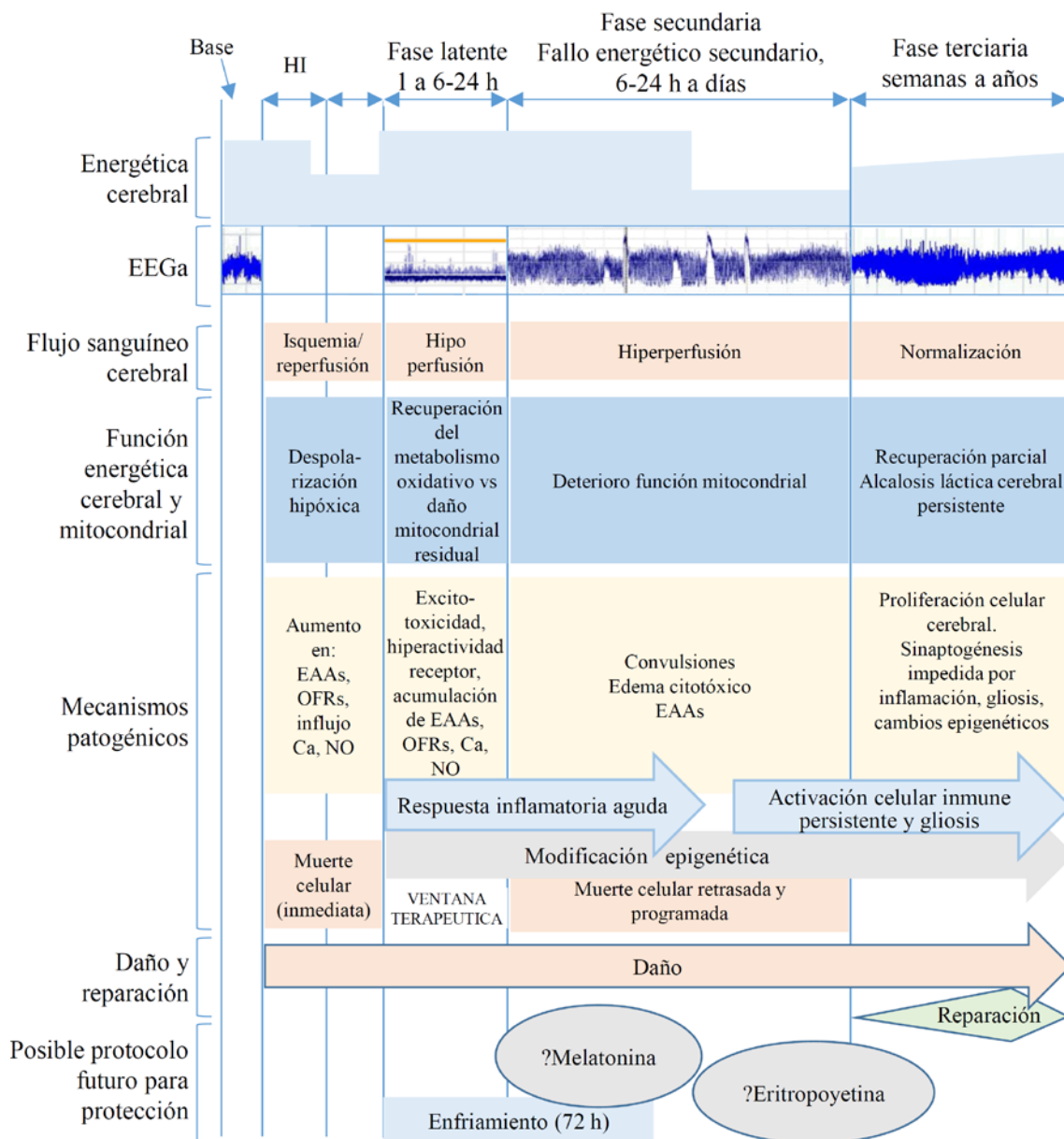


Figura 2: Fases en la génesis de la lesión cerebral anóxica.

(EEGa: Electroencefalograma integrado por amplitud; HI: Hipoxia-isquemia; EAAs: Aminoácidos excitatorios; NO: Óxido nítrico)

Además, el RN presenta una serie de características especiales que lo hacen más susceptible al daño hipóxico-isquémico²⁷:

- Posee una alta tasa metabólica y de extracción de oxígeno junto con mecanismos de captación de glucosa inmaduros.
- Tiene un mayor desarrollo de los mecanismos excitotóxicos relacionados con el glutamato, con receptores que responden con mayor intensidad y más fácilmente a dicho aminoácido.
- Tiene una mayor vulnerabilidad al estrés oxidativo en relación con una oligodendroglía muy activa, con un metabolismo férrico aumentado (mayor disponibilidad de hierro) y con un déficit relativo de antioxidantes.
- El mecanismo de autorregulación del flujo sanguíneo cerebral es inmaduro y tiene un rango estrecho en el neonato, además se ve comprometido por la hipoxia que junto con la presencia típica de circulación terminal sin anastomosis, condicionan una gran susceptibilidad a la isquemia.

Centrándonos en los **cambios hemodinámicos**, la primera respuesta adaptativa ante la asfixia es la bradicardia junto con el incremento de la tensión arterial (TA) sistémica para mantener un aceptable gasto cardíaco, seguida de una redistribución del flujo sanguíneo, con perfusión preferencial de los órganos vitales, esto es, el territorio cerebral, suprarrenal y coronario. Si bien el cerebro posee la propiedad de mantener un flujo constante dentro de un amplio margen de valores de la TA (mecanismo de autorregulación del flujo sanguíneo cerebral), en situación de asfixia se pierde dicha propiedad y el flujo sanguíneo cerebral (FSC) se modifica en relación directa con los cambios de TA. Con el mantenimiento de la asfixia se produce una depresión miocárdica, y por tanto, una caída de la TA, lo que se traduce en disminución de la perfusión cerebral. Por otro lado, la presión intracraneal (PIC) influye en la presión de perfusión cerebral (PPC), pues la PPC es el resultado de la diferencia entre la TA y la PIC ($PPC = TA - PIC$), de forma que los incrementos en la PIC debidos al edema cerebral también disminuyen la perfusión cerebral. Sin embargo, en los estudios de hipoxia-isquemia neonatal en los que se monitorizó de forma continua la PIC a nivel subaracnoideo, se mostró que los cambios clínicos y electroencefalográficos precedían al pico de incremento de la PIC, lo que indica que el edema cerebral es un epifenómeno secundario al daño isquémico, con la consiguiente necrosis celular, y no una causa determinante de isquemia.

I.3.1. Neurotoxicidad mediada por glutamato

El glutamato es el aminoácido no esencial libre más abundante en el cerebro y el neurotransmisor excitatorio predominante en el sistema nervioso central (SNC) de los vertebrados^{28,29}. En condiciones fisiológicas, contribuye al mantenimiento de la sinapsis y la plasticidad celular, con una importante contribución en los fenómenos de aprendizaje y memoria y como reserva de energía (en situaciones en las que el aporte de glucosa se encuentra reducido a nivel cerebral, el glutamato se oxida a oxalacetato proporcionando 12 moléculas de ATP por cada molécula de glutamato)³⁰. Se acumula en vesículas en la terminal sináptica y se libera al espacio sináptico por exocitosis por un mecanismo calcio dependiente³¹. En la hendidura sináptica actúa sobre los receptores postsinápticos glutamatérgicos, ionotrópicos y metabotrópicos, produciendo su activación. Dentro de los receptores ionotrópicos se incluyen el receptor N-metil-D-aspartato (NMDA), ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico (AMPA) y kainato. Estos receptores de glutamato, el más significativo el receptor NMDA, son muy importantes para el cerebro en desarrollo y la neurotransmisión en el cerebro neonatal, de ahí que la expresión y actividad de los mismos esté incrementada en estas fases cruciales del neurodesarrollo.

En condiciones normales, la mayor concentración de glutamato está en el SNC a nivel intracelular. En plasma la concentración de glutamato se sitúa en torno a 50-100 $\mu\text{mol/L}$, a nivel cerebral en 10.000-12.000 $\mu\text{mol/L}$ de localización fundamentalmente intracelular y en los fluidos extracelulares la concentración es tan sólo de 0.5-2 $\mu\text{mol/L}$. El mantenimiento de un equilibrio adecuado de las concentraciones de glutamato en el líquido cefalorraquídeo (LCR) es crítico para preservar la función e integridad neuronal y evitar los efectos neurotóxicos del glutamato. Dicho equilibrio, manteniéndose niveles bajos de glutamato a nivel extracelular, se consigue gracias a la barrera hematoencefálica, a la eliminación de glutamato desde la hendidura sináptica una vez ejercido su acción por su reabsorción por las células de la glía, que lo transforman en glutamina por acción de la glutamina sintetasa, transfiriéndose de nuevo al interior de la neurona y pudiendo actuar como sustrato para la nueva síntesis de glutamato³¹ y a la existencia de un transporte activo de glutamato hacia el interior de las neuronas y de las células de la glía. Existen varios transportadores de aminoácidos excitatorios (EAATs)

que son Na^+ -dependientes como: EAAT1 (GLAST) y EAAT2 (GLT-1) que son transportadores gliales y EAAT3 y EAAT4 que son transportadores neuronales, siendo el principal transportador el EAAT2 encargado de remover sobre el 90% del glutamato extracelular en el cerebro adulto^{32,33}.

Así es que, en condiciones fisiológicas una vez ejercido su acción a nivel postsináptico, el glutamato es recaptado rápidamente a través de dichos transportadores, siendo estos unos de los principales responsables de renovar el glutamato del espacio extracelular y mantener unos niveles de glutamato no tóxicos. También se han localizado estos transportadores a nivel de la placenta, ejerciendo una función activa en el mantenimiento de unos niveles adecuados de glutamato a nivel del cerebro fetal al favorecer la absorción de glutamato desde la sangre fetal hacia la placenta. En cuanto a la barrera hematoencefálica, en condiciones normales existe una difusión unidireccional de glutamato desde el LCR a la sangre mediado por los capilares de las células endoteliales. También existen otros mecanismos endógenos de neuroprotección, como se han visto en modelos animales, relacionados con los receptores de glutamato como es la reducción en la expresión de subunidades del receptor NMDA para minimizar los efectos tóxicos de las elevaciones de glutamato³⁴. En situaciones de privación de glucosa, a nivel de la sangre también existen dos enzimas limpiadoras de glutamato, la **GPT** (transaminasa glutámico-pirúvica) y la **GOT** (transaminasa glutámico-oxaloacética) que en presencia de sus co-sustratos (piruvato y oxaloacetato, respectivamente), convierten el glutamato en cetilglutarato y sus metabolitos, intermediarios del ciclo de Krebs (*Figura 3*).

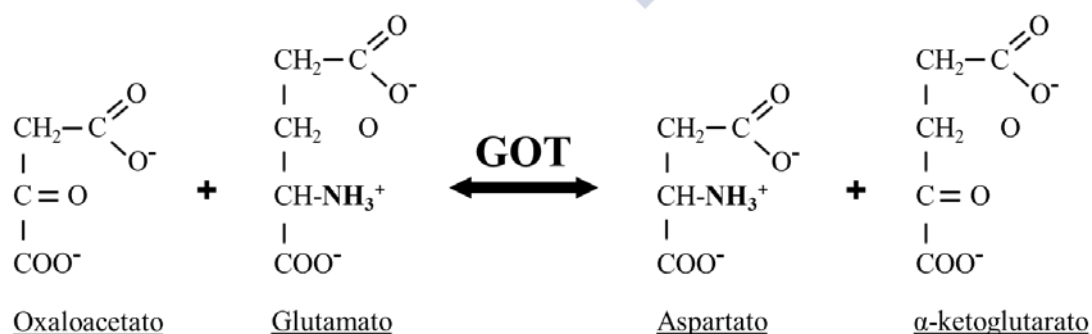


Figura 3: GOT como enzima limpiadora de glutamato.

(GOT: Transaminasa glutámico-oxaloacética)

Por otro lado, el glutamato juega un papel fundamental en el daño cerebral tras la hipoxia-isquemia. La elevación de calcio intracelular como resultado de la alteración de las bombas iónicas, produce una rápida liberación de glutamato, entre otros aminoácidos excitatorios, a nivel de la hendidura sináptica que resulta en una excesiva activación de los receptores post-sinápticos, perturbándose la homeostasis iónica permitiendo a su vez fundamentalmente la entrada de calcio, favoreciéndose el edema celular y la muerte celular por necrosis. Los receptores NMDA permiten la entrada de calcio, los AMPA de sodio, aunque también son permeables al calcio³⁵, los kainato de calcio y los metabotrópicos permiten la formación de inositoltrifosfato (IP3) que también libera más calcio intracelular (*Tabla 2 y Figura 4*). Esto junto a la alteración de los mecanismos intracelulares de eliminación del calcio, dan lugar a una elevación transitoria del calcio intracelular que a través de distintos mecanismos excitotóxicos, descritos anteriormente, provocan la muerte neuronal³⁶.

A su vez, la activación del receptor NMDA está vinculado con la activación de la óxido nítrico sintetasa, originándose neurotoxicidad por la producción de NO. Otros mecanismos que contribuyen al daño celular favoreciendo el aumento de calcio intracelular son la activación de calpinas, escindiéndose el intercambiador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ y la activación de canales de melastina, como el canal de melastina permeable al calcio TRPM7.

Además, existen otros factores que contribuyen al daño mediado por el glutamato y que son responsables de la mayor susceptibilidad a la isquemia del cerebro en desarrollo, como son la mayor expresión de receptores post-sinápticos del glutamato en el cerebro en desarrollo y la alteración de la funcionalidad y la expresión de los EAATs. En condiciones de isquemia, la función de transporte de los EAATs se invierte, y el glutamato sale del espacio intracelular al extracelular. También se inducen cambios en la expresión de estos transportadores y de hecho, a las 24 horas de un accidente cerebro vascular (ACV) isquémico la expresión de EAAT2 se reduce un 50%. También existe una fuente de glutamato extracelular no sináptico que es el antitransporte de cistina/glutamato (sistema xc-) que se expresa predominantemente en la microglía, donde la exportación extracelular de glutamato está acoplado a la importación de cistina y que en condiciones de isquemia, contribuye a la liberación patológica de glutamato extracelular (*Figura 5*).

Receptores ionotrópicos de glutamato				
Clase de receptor	Agonista	Antagonista	Cinética	Permeabilidad
AMPA	Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico	CNQX (6-ciano-7-nitroquinoxalino-2,3-diono) GYK153655 (2,3-benzodiazepina derivativas)	Rápida	Na ⁺ , K ⁺ , (Ca ²⁺ en pocos casos)
NMDA	N-metil-D-aspartato	APV (Ácido 2-amino-5-fosfonoalérgico)	Lenta	N ⁺ , K ⁺ , Ca ²⁺
Kainato	Ácido kainico Ácido domoico	CNQX	Rápida	Na ⁺ , K ⁺

Tabla 2: Receptores ionotrópicos de glutamato.

(AMPA: Ácido- α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico; NMDA: N-metil-D-aspartato)

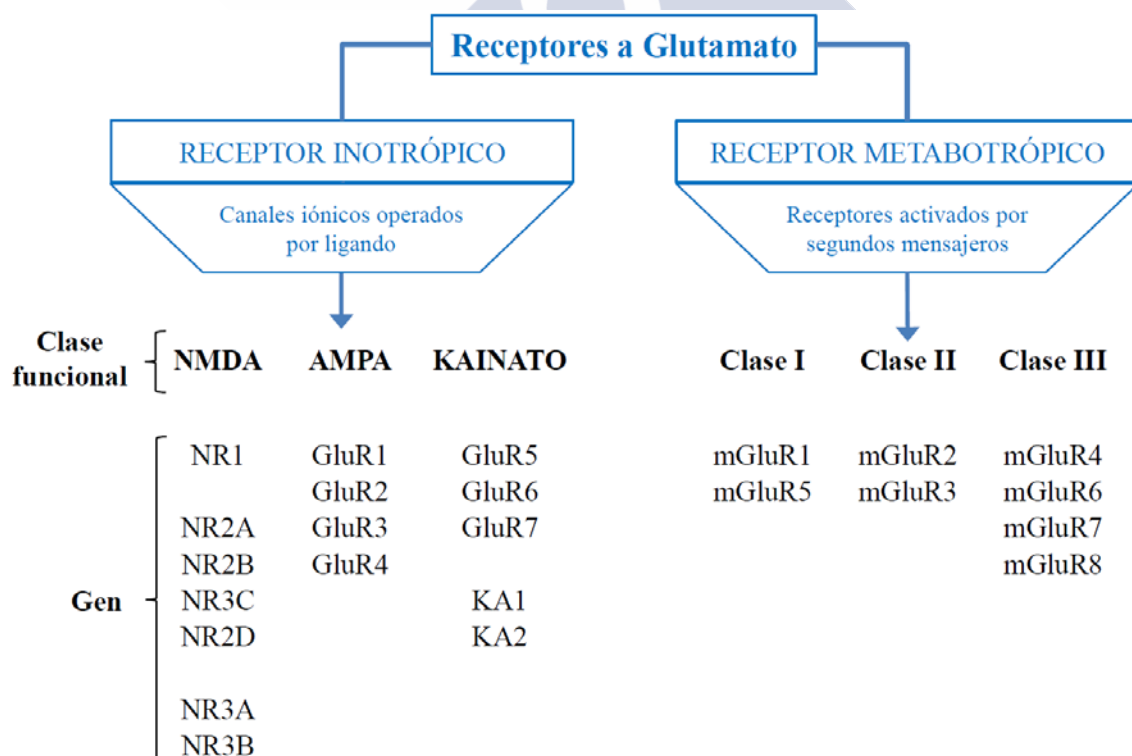
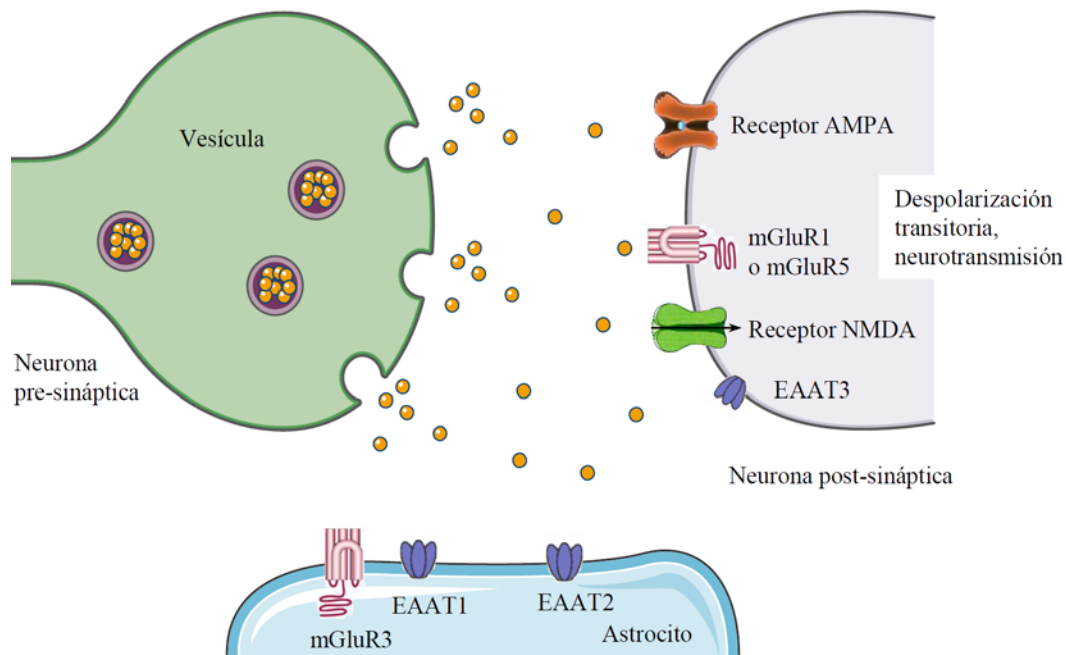


Figura 4: Receptores ionotrópicos y metabotrópicos de glutamato.

(NMDA: N-metil-D-aspartato; AMPA: Ácido- α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico)

A. Fisiológico



B. Patológico Ej. isquemia

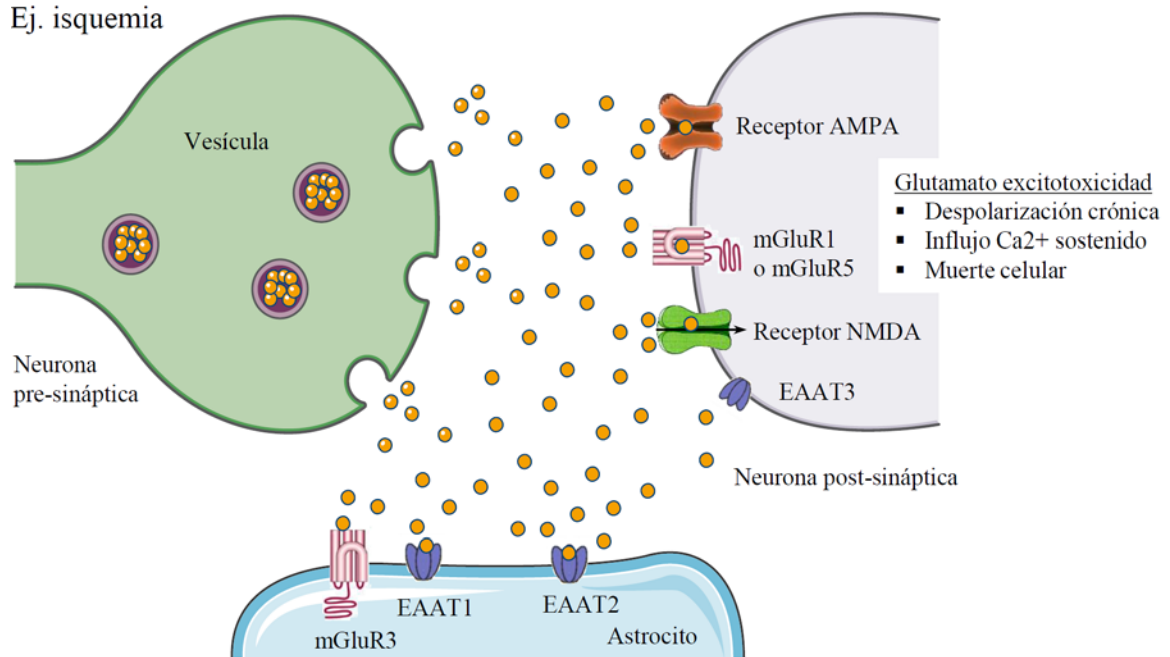


Figura 5: Neurotoxicidad mediada por glutamato. A) En condiciones fisiológicas. B): En condiciones patológicas.

(NMDA: *N*-metil-*D*-aspartato; AMPA: Ácido- α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico; EAATs: Transportadores de aminoácidos excitatorios)

La neurotoxicidad mediada por glutamato también se ha relacionado con otras patologías agudas cerebrales como en el daño cerebral de origen traumático y en la meningitis³⁷⁻⁴⁰, así como también en procesos neurológicos crónicos como en el glaucoma, la epilepsia, la enfermedad de Parkinson, esclerosis múltiple, en la demencia asociada al virus de la inmunodeficiencia humana y en la esclerosis lateral amiotrófica⁴¹⁻⁴³.

I.4. MANIFESTACIONES CLÍNICAS

I.4.1. Clínica neurológica. Escalas de gravedad

Todos los RN con antecedentes de asfixia perinatal deben tener un detallado examen neurológico para evaluar la existencia de disfunción neurológica y graduar su gravedad. Aunque los signos que definen la gravedad de la EHI muestran un espectro continuo de alteración, existen una serie de esquemas de graduación, más cualitativos que cuantitativos, que clasifican la profundidad de la encefalopatía en distintos estadios de gravedad. La EHI fue originalmente descrita por *Amiel-Tison* en 1969 quien desarrolló la primera escala de graduación clínica⁴⁴, seguida a continuación por el desarrollo de otras escalas como la de *Sarnat*⁴⁵ (Tabla 3), *García-Alix et al*⁴⁶ (Tabla 4), *Miller et al*⁴⁷, y la de *Thompson et al*⁴⁸, siendo la más utilizada actualmente la clasificación de Sarnat. En general, las clasificaciones de Sarnat, Amiel-Tison, García-Alix y Thompson valoran la gravedad principalmente sobre la base del nivel de conciencia, la alteración del tono muscular y los reflejos, y la existencia de convulsiones clínicas. Así, estas clasificaciones se fundamentan en la premisa de que cuanto mayor es la alteración en el nivel de conciencia, más grave es el cuadro clínico y puede graduarse en leve, moderado o grave. A su vez, la caracterización clínica de la gravedad de la asfixia es un barómetro sensible de la gravedad de la agresión al SNC. De forma que, la repercusión de la EHI dependerá del grado de afectación, en donde la clasificación clínica de la gravedad tiene una importante utilidad pronóstica durante los primeros días de vida al correlacionarse estrechamente con la probabilidad de secuelas neurológicas y permite el asiento de la indicación de tratamientos específicos como la hipotermia.

De forma general, las formas leves suelen manifestarse por un estado de hiperalerta, hiperexcitabilidad, con tono muscular normal y sin convulsiones; las moderadas con hipotonía, disminución de los movimientos y con frecuencia convulsiones y las graves con estupor, flacidez, ausencia de reflejos primitivos y normalmente convulsiones.

Signos	Estadio 1	Estadio 2	Estadio 3
Nivel de conciencia	Hiperalerta	Letárgico	Estupor/coma
Tono muscular	Normal	Hipotónico	Flácido
Postura	Normal	Flexión	Descerebrado
Reflejos tendinosos/clonus	Hiperactivo	Hiperactivo	Ausente
Mioclónías	Presentes	Presentes	Ausentes
Reflejo de Moro	Fuerte	Débil	Ausente
Pupilas	Midriasis	Miosis	Reflejo pobre/ anisocoria
Crisis convulsivas	No	Común	Descerebración
EEG	Normal	Bajo voltaje cambiando a actividad convulsiva	Supresiones a isoelectrico
Duración	Menos de 24 horas	1 a 14 días	Días a semanas
Pronóstico	Bueno	Variable	Muerte/déficit neurológico importante

Tabla 3: Clasificación de la EHI según criterios de Sarnat.

(EEG: Electroencefalograma)

Parámetro	0	1	2	6	8
Capacidad para despertar y mantener la alerta	Normal	Despierta	Despierta con cierta dificultad a estímulos nociceptivos, mantiene la alerta breves segundos	Despierta con gran dificultad a estímulos Nociceptivos, vuelve rápidamente al sueño	No despierta ante estímulos nociceptivos
Actividad Espontánea (valoración cuantitativa)	Normal	Excesiva (temblor, mioclonías, sacudidas)	Actividad disminuida	Actividad muy disminuida (sólo ante estímulos nociceptivos)	Actividad ausente o tremor continuo en reposo
Actividad espontánea (valoración cualitativa)	Movimientos fluidos, variables y contorneo	No óptimos, pero fluidos y variables	Pobre repertorio de movimientos generales	No valorable o ausencia de variabilidad. Sólo respuestas de retirada	Rígidlos o estereotipados. Remedan decortización o descerebración tras estimulación
Postura	Adecuada flexión y adducción de las 4 extremidades	Pobre flexión y adducción en las EESS	Pobre flexión tanto en EESS como en EEII	Postura flácida o tónica pero no opistótonos, descerebración o decortización	Postura flácida o tónica sostenida: opistótonos, descerebración o decortización mantenida
Reflejos miotáticos	Normal	Hiperactivos	Débiles	Ausentes	
Respiración	Normal o taquipnea por acidosis		Periódica		Apnea
Convulsiones clínicas	Ausentes			Aisladas (<1 por hora)	Repetidas o continuas
EEGa. Convulsiones Eléctricas (no clínicas)	Ausentes			Aisladas (<1 por hora)	Repetidas o continuas
EEGa. Trazado de fondo	Continuo de voltaje normal. Ciclos de sueño presentes.	Continuo de voltaje normal. No ciclos de sueño	Discontinuo (límite inferior del trazado en 5 µV)	Brote supresión	Continuo de bajo voltaje. Hipoactivo (plano)

Tabla 4: Escala de GarcíaAlix.
(EESS: Extremidades superiores; EEII: Extremidades inferiores; EEGa: Electroencefalograma integrado por amplitud; µV: Microvoltios)

Según las puntuaciones obtenidas con esta escala, se puede clasificar el grado de EHI en:

- No EHI: <2 puntos
- EHI leve: 2-6
- EHI significativa (moderada o grave): ≥ 6

La escala modificada de *García-Alix* posee las ventajas de que se realiza en un menor tiempo pues se evalúan solamente 4 parámetros y que la evaluación es totalmente clínica, no se necesita tener el registro EEG (*Tabla 5*).

Severidad	Manifestaciones Clínicas	
Leve	A <3 días	
<i>Capacidad para despertar</i>	Normal	
<i>Tono muscular</i>	Hipotonía global, >distribución proximal superior	B >3 días
<i>Respuestas motoras</i>	Normales o ligeramente disminuidas	
<i>Reactividad</i>	Normal o hiperexcitabilidad: ROT aumentados, tremor y/o mioclonus	
Moderada	A	B
<i>Capacidad para despertar</i>	Letargia o estupor moderado	Convulsiones aisladas o repetitivas
<i>Tono muscular</i>	Hipotonía global, > distribución proximal superior	
<i>Respuestas motoras</i>	Disminuidas pero de calidad normal	
<i>Reactividad</i>	ROT disminuidos, reflejos primitivos débiles	
Severa	A	B
<i>Capacidad para despertar</i>	Coma o estupor severo	Signos de disfunción del tallo cerebral
<i>Tono muscular</i>	Hipotonía global	
<i>Respuestas motoras</i>	Ausentes o estereotipadas. Convulsiones o estado epiléptico	
<i>Reactividad</i>	Reflejos primitivos ausentes	

Tabla 5: Escala modificada de García-Alix, 2008. A: Manifestaciones clínicas en <3 días de vida. B: Manifestaciones clínicas en >3 días de vida.

El score de *Thompson* (*Tabla 6*) es un método simple, rápido de hacer, que no requiere un entrenamiento adicional y un equipamiento determinado. En esta escala se valora el examen neurológico en base al tono, el nivel de conciencia, la presencia de crisis comiciales, la postura, el reflejo de Moro y los reflejos de prensión y succión, el desarrollo de la respiración y la tensión de la fontanela⁴⁸. Una puntuación superior a 7

en las primeras 6 horas de vida se usa como criterio para incluir al paciente en hipotermia. De forma natural se ve que la puntuación en la Escala de Thompson varía en las primeras 6 horas de vida, con una tendencia a mejorar (disminuir la puntuación) a lo largo de las horas, por ello la aplicación de la escala de forma precoz (en las primeras 3 horas) dará lugar a que las puntuaciones sean más altas y que se incluyan más pacientes en hipotermia⁴⁹.

Signo	Score			
	0	1	2	3
Tono	Normal	Hiper	Hipo	Flácido
Nivel de conciencia	Normal	Hiperalerta	Letargia	Coma
Crisis	No	Infrecuentes, <3 por hora	Frecuentes >2 por hora	
Postura	Normal	Movimientos cíclicos de extremidades con puños cerrados	Flexión fuerte distal	Descerebración
Reflejo Moro	Normal	Parcial	Ausente	
Presión palmar	Normal	Pobre	Ausente	
Succión	Normal	Pobre	Ausente	
Respiración	Normal	Hiperventilación	Apneas ocasionales	Apnea
Fontanela	Normal	Llena, no tensa	Tensa	
Fecha y hora:				
Total:				

Tabla 6: Score de Thompson

I.4.2. Clínica sistémica. Enfermedad hipóxico-isquémica

Además de la posible encefalopatía aguda, la agresión hipóxico-isquémica puede determinar disfunción o daño de variable intensidad en otros órganos o sistemas. Así es que, hasta un porcentaje no desdeñable de pacientes sometidos a asfixia presentan compromiso orgánico. En el estudio de *Roca et al* de 1992, hallaron una incidencia del 48,8% de manifestaciones extraneurológicas en RN con EHI⁵⁰. Incluso la incidencia puede ser mayor si se valora en global a RN asfícticos, así pues puede existir afectación extraneurológica sin sintomatología de EHI. *Perlman et al* hablan de una incidencia del 60% de enfermedad hipóxico-isquémica en RN asfícticos⁵¹.

Por orden de frecuencia el sistema más afectado tras la afectación del SNC, es el renal (47-56%)⁵²⁻⁵⁴, seguido por el cardíaco (29%), gastrointestinal (GI) (29%) y pulmonar (26%).

Afectación renal: El daño renal agudo que sigue a la hipoxia-isquemia perinatal, tiene un origen prerrenal fundamentalmente, relacionado con el intento de mantener el flujo sanguíneo hacia los órganos nobles, con el consiguiente estado de hipoperfusión renal que da lugar a la necrosis tubular aguda o necrosis cortical renal⁵⁵⁻⁵⁸. Es frecuente encontrar una disfunción renal transitoria, oliguria, proteinuria, hematuria y/o hiperazotemia. Los niños más gravemente afectados pueden presentar insuficiencia renal aguda. Por ello, en todos los casos es importante vigilar la diuresis y realizar pruebas complementarias.

Afectación cardíaca: La bradicardia sinusal mantenida sin repercusión clínica y que cede espontáneamente en días es frecuente y parece estar en relación con el predominio del tono parasimpático. Algunos RN tendrán lesión miocárdica hipóxico-isquémica que puede manifestarse clínicamente por hipotensión y por un soplo sistólico en el borde esternal izquierdo debido a regurgitación tricuspídea o en el ápex por regurgitación mitral por afectación de los músculos papilares. Excepcionalmente la afectación es tan severa, como para producir insuficiencia cardíaca.

Afectación GI: La intolerancia digestiva con vómitos y/ o restos gástricos sanguinolentos es frecuente. En casos muy graves, puede producirse una enterocolitis isquémica, manifestada por diarrea mucosanguinolenta y es excepcional la enterocolitis

necrosante.

Afectación hepática: Es frecuente la elevación transitoria de las transaminasas sin repercusión clínica. Puede existir coagulopatía por consumo de factores de la coagulación si existe un cuadro de coagulación intravascular diseminada (CID), en cuyo caso veremos el factor V y VIII disminuidos o por hepatopatía, en cuyo caso veremos el factor V disminuido porque es de síntesis hepática y el factor VIII aumentado porque es de síntesis extrahepática y se aclara en el hígado.

En el trabajo de *Chhavi et al* midieron las cifras de GPT en pacientes controles y recién nacidos asfixiados en las primeras 24 horas, a las 24-72 horas y a los 6-12 días. Encontraron que hasta un 56% de los casos tenían daño hepático asociado a la asfixia, estando la GPT elevada en las 3 determinaciones temporales⁵⁹.

Afectación pulmonar: Es frecuente que inicialmente exista una polipnea compensadora de la acidosis. Ocasionalmente se observa un cuadro de dificultad respiratoria leve-moderada compatible con hipertensión pulmonar transitoria. Entre las complicaciones más graves, destacan la hemorragia pulmonar, la hipertensión pulmonar persistente y excepcionalmente, el síndrome de distrés respiratorio tipo adulto.

Efectos metabólicos: Pueden producirse alteraciones electrolíticas, fundamentalmente hipocalcemia e hipomagnesemia y de los niveles de glucemia, afectándose secundariamente la funcionalidad de distintos órganos y pudiendo agravarse el daño del SNC.

I.5. ESTUDIOS COMPLEMENTARIOS

Diferentes estudios se han mostrado útiles en el diagnóstico y manejo de la asfixia perinatal, que ayudan a definir el origen hipóxico-isquémico de la encefalopatía y a localizar y precisar la extensión del daño, permitiendo estimar el riesgo de secuelas neurológicas. En ocasiones, también permiten conocer la cronología de la lesión y descubrir patologías no esperadas o lesiones adquiridas con anterioridad al parto.

Dentro de las pruebas complementarias a realizar destacan las siguientes:

I.5.1. Pruebas electroencefalográficas

I.5.1.1. Electroencefalograma (EEG) estándar

Se pueden reconocer distintas alteraciones y patrones electroencefalográficos según el grado de afectación, así es que de forma general en la EHI leve el EEG suele ser normal o subnormal, en la moderada suele observarse un patrón continuo de bajo voltaje de 5 a 25 microvoltios (μV), continuo lento o discontinuo tipo A (elementos gráficos fisiológicos) o tipo B (elementos gráficos patológicos) y en las formas graves un patrón de bajo voltaje con ritmo Theta, paroxístico, periódico o inactivo con amplitud inferior a 5 μV .

Las crisis eléctricas o electro-clínicas suelen observarse en las formas moderadas o graves.

De forma general, el EEG estándar presenta un uso limitado en la EHI pues existe dificultad para mantener una monitorización prolongada, excesivo número de electrodos que dificultan el acceso a las venas del cuero cabelludo y la evaluación ultrasonográfica cerebral, alta propensión a interferencias eléctricas por los equipos del entorno, dificultades en la interpretación de los resultados por parte del personal no entrenado en neurofisiología y supone un importante consumo de tiempo para la lectura de los registros. Además, si se aplica y realizan registros de forma intermitente se pierde información sobre la evolución de las alteraciones del trazado de base, el desarrollo de los estados de sueño-vigilia y la presencia de convulsiones que pueden presentarse de forma esporádica. De ahí, la mayor aplicabilidad en la práctica clínica del electroencefalograma integrado por amplitud (EEGa).

Ahora bien, de forma general el EEG estándar debería ser realizado en cualquier momento, si se observan convulsiones clínicas o eléctricas, y antes del alta, si se apreciaron alteraciones⁶⁰.

I.5.1.2. Electroencefalograma integrado por amplitud (EEGa)

Se basa en que las señales del EEG se amplifican, rectifican y comprimen en el tiempo. El trazado se visualiza como una banda de densidad variable que refleja la actividad eléctrica cerebral global, mostrando las variaciones en la amplitud máxima y mínima del EEG expresada en μV , de forma que el margen superior de la banda expresa el nivel máximo de voltaje y el inferior el nivel mínimo.

Según el reconocimiento visual de trazados (trazado base) se establece la siguiente clasificación:

- **Trazado continuo:** Se visualiza como una banda estrecha, con el límite superior por encima de $10\ \mu\text{V}$ (entre 10 y $25\ \mu\text{V}$) y el inferior por encima de $5\ \mu\text{V}$. Es el trazado que se considera normal (*Figura 6*).
- **Discontinuo:** Se visualiza como una banda ancha, con el límite superior por encima de $10\ \mu\text{V}$ e inferior por debajo de $5\ \mu\text{V}$ (*Figura 7*).
- **Continuo de bajo voltaje:** Se visualiza como una banda estrecha con el límite superior por debajo de $10\ \mu\text{V}$ e inferior por debajo de $5\ \mu\text{V}$ (*Figura 8*).
- **Brote-supresión:** Se visualiza como una banda estrecha con amplitud entre 0 y $1\ \mu\text{V}$ sin variabilidad y brotes con amplitud superior a $25\ \mu\text{V}$ (*Figura 9*).
- **Plano o inactivo:** Sin apenas actividad (límite superior e inferior por debajo de $5\ \mu\text{V}$) (*Figura 10*).

Estos 4 últimos trazados son los que se consideran patológicos.

El trazado con actividad continua de voltaje normal muestra engrosamientos cíclicos regulares (aumento del ancho de la banda) que representa una actividad más discontinua durante el estado de sueño tranquilo y una banda más estrecha durante el estado de sueño activo y vigilia. Se habla de **ciclos de sueño-vigilia** y son indicadores de integridad y maduración de la función cerebral (*Figura 6*).

La actividad paroxística ictal puede reconocerse por una elevación transitoria del margen inferior del trazado (reflejando el incremento de voltaje) acompañada o no de la

elevación del margen superior. Se debe acompañar de ondas estereotipadas, rítmicas y monomorfas durante más de 10 segundos en el EEG crudo (*Figura 11*). Se habla de crisis aislada si se presenta 1 crisis o menos a la hora; de crisis repetidas si se presentan 2 o más a la hora y de estatus epiléptico si se presentan crisis continuas durante más de 30 minutos (*Figura 12*).

La ventaja principal del EEGa es que permite hacer una monitorización continua de la actividad cortical y reconocer los diferentes tipos de trazados y su curso temporal, lo cual tiene importantes implicaciones pronósticas. Otras de sus ventajas es que permite detectar crisis comiciales bioeléctricas sin expresión clínica y monitorizar la respuesta a los tratamientos anticonvulsivantes⁶¹.

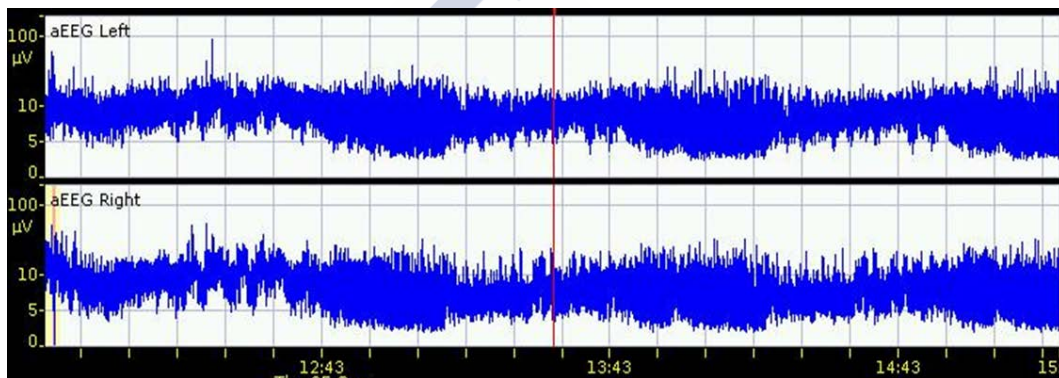


Figura 6: EEGa trazado continuo. Ciclos de sueño-vigilia.

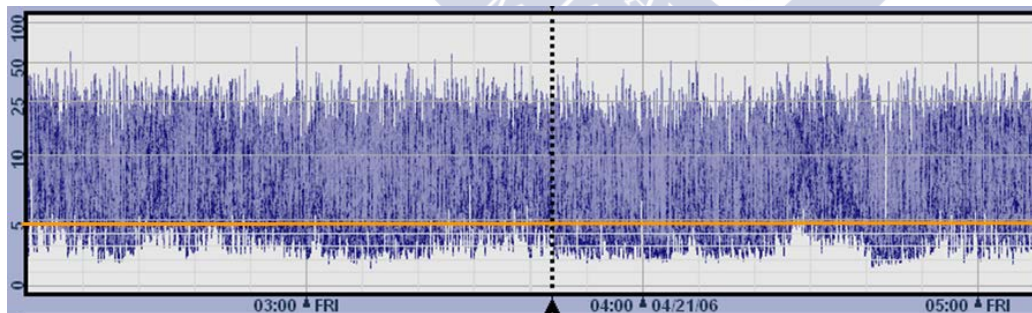


Figura 7: EEGa trazado discontinuo.

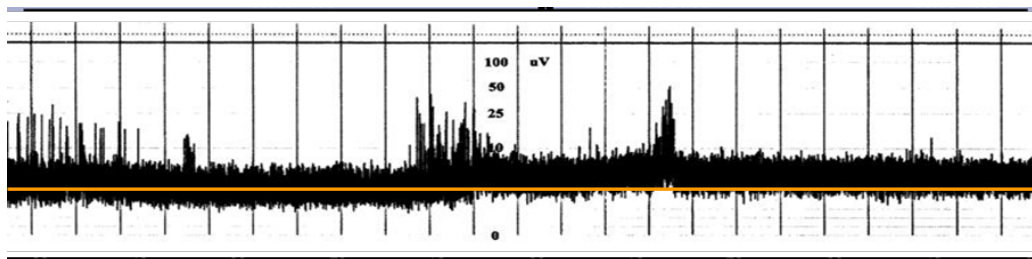


Figura 8: EEGa continuo de bajo voltaje.

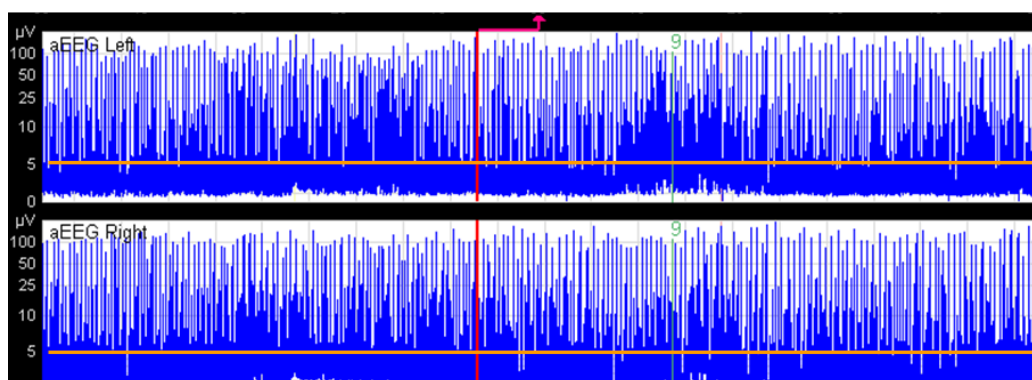


Figura 9: EEGa brote-supresión.

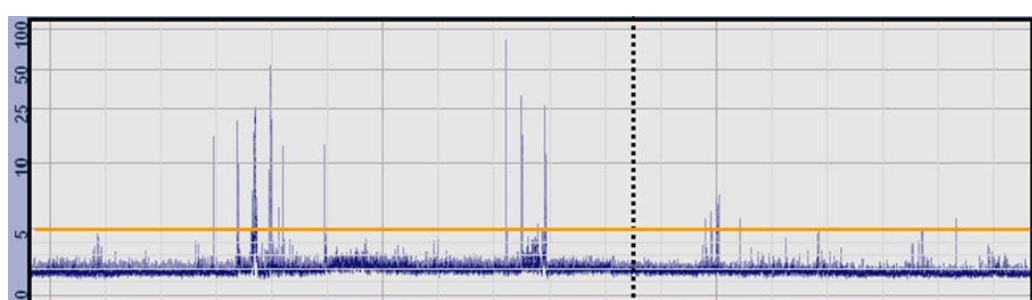


Figura 10: EEGa plano o inactivo.

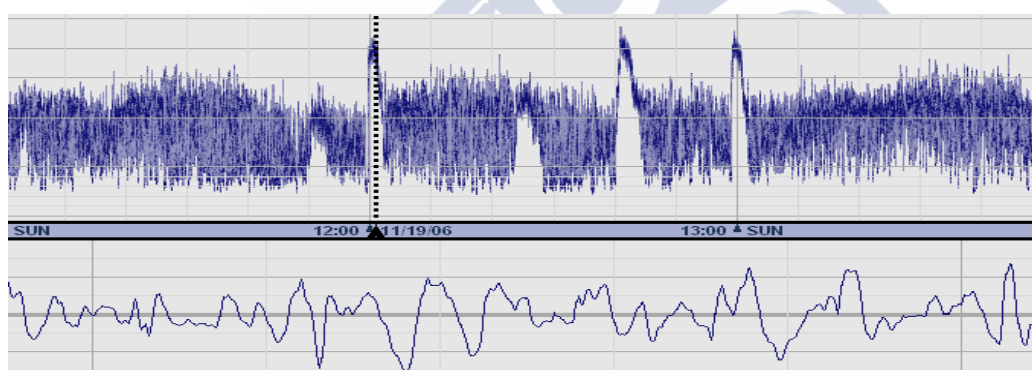


Figura 11: EEGa actividad paroxística aislada.

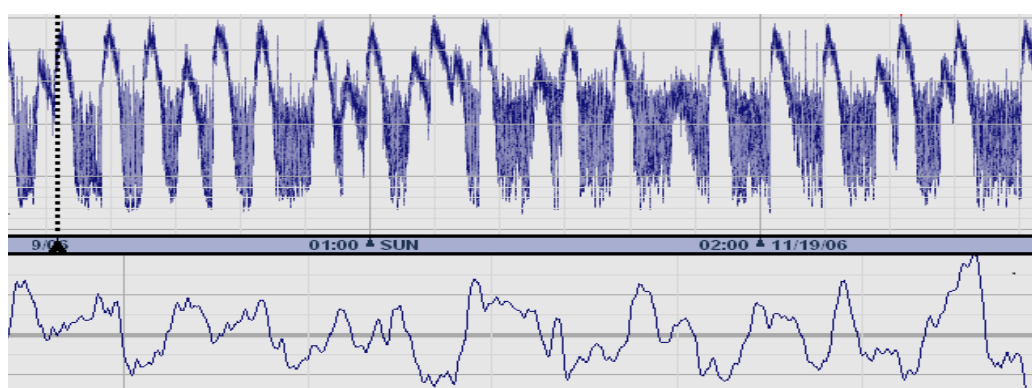


Figura 12: EEGa estatus epiléptico.

I.5.2. Pruebas de neuroimagen

I.5.2.1. Ecografía cerebral

La ecografía continúa siendo la primera modalidad de neuroimagen en el paciente con EHI dado que es una técnica no invasiva, barata y de fácil acceso⁶². Así es que, la ecografía transfontanelar debe ser realizada al ingreso en todo paciente que presente un cuadro encefalopático para excluir anomalías del desarrollo cerebral, poner en evidencia daño prenatal o bien detectar anomalías que señalen un origen diferente de la encefalopatía neonatal. Por ejemplo, la hipoplasia del cuerpo calloso puede sugerir hiperglicemia no cetósica y la presencia de marcados quistes germinolíticos apunta a un trastorno mitocondrial, perioxosomal o infecciones congénitas⁶⁰.

Durante los primeros días, en la asfixia perinatal suelen observarse datos compatibles con edema cerebral, objetivados por un aumento de la ecogenicidad del parénquima cerebral con ventrículos colapsados (*Figura 13*). La afectación de la corteza y del tálamo o ganglios de la base (GB) suele verse a las 24-48 horas de la agresión. En la progresión y seguimiento, pueden presentar signos de atrofia cerebral y/o encefalomalacia multiquística (*Figura 14*).

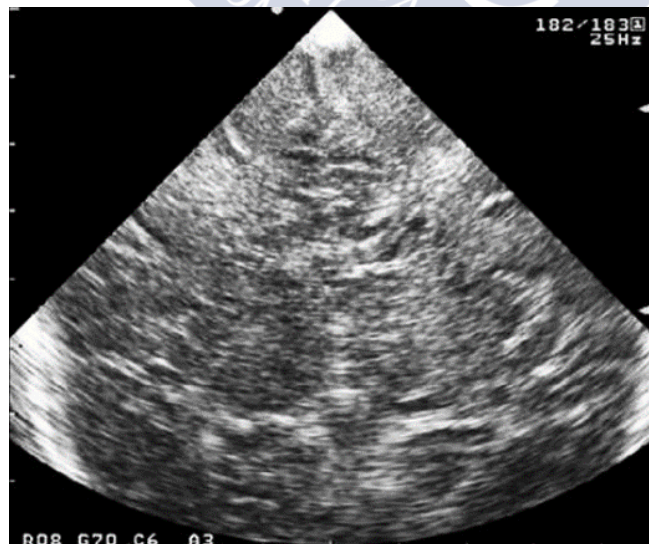


Figura 13: Ecografía transfontanelar: Datos de edema cerebral (hiperecogenicidad difusa cerebral, colapso ventricular)



Figura 14: Ecografía transfontanelar: Encefalomalacia multiquística (flechas).

Con la ecografía doppler se pueden medir diferentes parámetros muy útiles en la asfixia perinatal y con implicaciones en el pronóstico, entre ellos la Velocidad media (Vm) del flujo sanguíneo cerebral, el Índice de resistencia (IR) y el Índice de pulsabilidad (IP). Ver Anexo 2

Los valores normales de Vm e IR varían con la edad gestacional, presentando los RN pretérmino unas resistencias vasculares cerebrales más altas y produciéndose un aumento de la Vm con el aumento de la edad gestacional. De forma que en las primeras 24 horas se consideran valores normales de IR 0.75 ± 0.12 y Vm 0.09 ± 0.03 m/s para los RN prematuros y de IR 0.70 ± 0.10 y Vm 0.12 ± 0.01 m/s para los a término. Tras el nacimiento, caen las resistencias vasculares cerebrales y el IR disminuye, en los pretérminos de 0.75 de media a 0.67 y de 0.70 a 0.64 en los a término. Se produce un aumento del flujo sanguíneo cerebral durante los primeros días de vida que se refleja por el aumento de la Vm de 0.12 m/s a 0.22 m/s en los RN a término y de 0.09 m/s a 0.19 m/s en los pretérmino.

En los neonatos a término con EHI se reconocen básicamente 2 patrones anormales de FSC: un **patrón de hiperemia** (Figura 15) por vasoparálisis de las arterias cerebrales y por el fenómeno de la reperfusión, con aumento de la Vm y disminución del IP y del IR (menor de 0.55) y un **patrón de isquemia o de alta resistencia** (Figura 16) con flujo diastólico ausente o invertido por aumento de la PIC, con disminución de la Vm y

aumento del IP y del IR. La ausencia de flujo diastólico se explica por el aumento de la PIC a valores próximos a la TA diastólica y el flujo invertido por una PIC superior al valor de la TA diastólica.

El IR es el principal parámetro doppler relacionado con el pronóstico en la EHI y nos permite hacer una aproximación a la temporalidad del evento hipóxico-isquémico, de forma que un IR inferior a 0.55 se asocia con una mayor probabilidad de evolución adversa y suele apreciarse generalmente entre los días 2 y 4 después del nacimiento, mientras que valores anormales en las primeras 6 horas de vida sugieren que la agresión hipóxico-isquémica ha acontecido 1-2 días antes del parto^{63,64}.

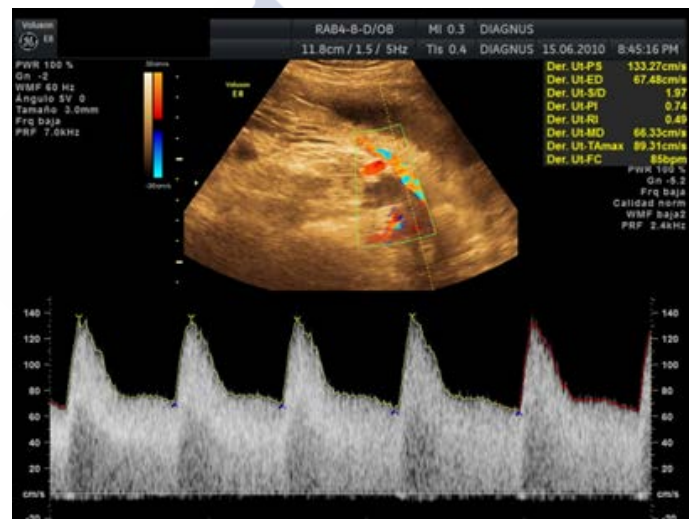


Figura 15: Ecografía doppler: Patrón de hiperemia.



Figura 16: Ecografía doppler: Patrón de isquemia (flujo diastólico ausente y flujo diastólico invertido).

I.5.2.2. Resonancia magnética cerebral

La resonancia magnética (RM) es la principal técnica de imagen para el diagnóstico del daño cerebral en la EHI en sus modalidades estándar T1 y T2, por difusión y por espectroscopia⁶⁵⁻⁶⁷.

Puede existir controversia en cuanto al momento ideal para realizar la RM tras la asfisia perinatal. Por un lado, se sabe por estudios realizados con RM convencional que las lesiones hipóxico-isquémicas siguen una evolución conocida y predecible en neuroimagen desde que se producen hasta que quedan establecidas aproximadamente al final de la primera semana de vida (las alteraciones suelen verse a partir de las 24-48 horas y se hacen más prominentes en torno a los 3-7 días). La pérdida de la hiperseñal fisiológica del brazo posterior de la cápsula interna (BPCI) es el hallazgo más precoz que puede verse en las secuencias convencionales. Por ello, el realizar una RM convencional muy precoz (sensibilidad del 0,75 y especificidad del 0,58) podría dar lugar a que se infraestime el daño con las consiguientes implicaciones pronósticas que ello supone. Hoy en día se considera que todos los pacientes con formas moderadas o graves sean incluidos en tratamientos con hipotermia y de hecho, la RM en los pacientes sometidos a hipotermia suele realizarse en la 2ª semana de vida (entre el 8º y los 15 días de vida). Por otro lado, fundamentalmente en los pacientes con formas moderadas o graves puede surgir la necesidad de tener que realizar una RM precoz en relación con la existencia de incongruencia entre el examen neurológico y los estudios neurofisiológicos o por la presencia de una importante afectación clínica junto con resultados sugestivos de pronóstico adverso en otras pruebas complementarias que nos hagan dudar sobre la idoneidad de un manejo terapéutico más o menos agresivo. En estas situaciones, con la RM precoz podemos obtener una información adicional con valor pronóstico que nos ayude y sustente en la información que vayamos a dar a la familia y en reconducir los cuidados en el paciente. Por ello, particularmente cuando se considere la limitación del esfuerzo terapéutico, se puede valorar realizar una RM en las primeras 96 horas de vida⁶⁰. Además, generalmente es a estos pacientes a los que se les suele ofrecer el tratamiento con hipotermia y en un estudio realizado por *Thais Agut et al* en la Agrupació Sanitaria Sant Joan de Déu- Clinic- Maternitat Hospital en Barcelona, se objetivó que existe una fuerte correlación entre los hallazgos encontrados

en la RM realizada precozmente (en torno al 4º día de vida) y la realizada más tardíamente (en la 2ª semana de vida) en los pacientes con EHI moderada o severa tratados con hipotermia⁶⁸. También se podrían solventar las limitaciones de la realización de una RM convencional de forma precoz, con el uso de otras modalidades de RM que detectan alteraciones más tempranamente que la modalidad convencional, como es el caso de la RM por espectroscopia o por difusión. De hecho, la RM por difusión es la modalidad más precoz (primeras 24 horas) para detectar cambios isquémicos en el cerebro, observándose áreas de restricción de la difusión del agua que rápidamente progresan en los siguientes días, con un pico de alteración a los 3-5 días y luego se desvanecen (pseudonormalización). Así es que, la RM por difusión realizada en la primera semana es la modalidad más específica y precoz para detectar alteraciones y la convencional T1/2 realizada en las primeras 2 semanas es la más sensible. La RM por espectroscopia de hidrógeno mostrará un incremento de ácido láctico (pico a 1,3 ppm) y una reducción del pico de N-acetil aspartato (pico a 2,0 ppm) con elevación por lo tanto, del ratio lactato/ N-acetil-aspartato⁶⁹.

En RM convencional se suelen encontrar los siguientes hallazgos: pérdida de la diferenciación entre la corteza y la sustancia blanca, aumento de la intensidad de señal en el área cortical perirrolándica, desaparición de la hiperseñal fisiológica del BPCI, hiperseñal del tálamo y los GB y en las zonas de unión fronterizas de los territorios vasculares, hiperseñal de la sustancia blanca, del tronco cerebral y cortical. Fundamentalmente se describen 2 patrones de daño que se relacionan con el tipo y la gravedad de la agresión: un **patrón de daño central** relacionado con una asfixia aguda grave y que se manifiesta por lesiones en los GB, tálamo, BPCI, hipocampo, corteza cerebral perirrolándica y, con relativa frecuencia, involucra al tronco encefálico, y un **patrón de daño de zonas fronterizas** relacionado con un insulto parcial prolongado o repetidas agresiones y que se manifiesta por alteraciones de la corteza y de la sustancia blanca en una topografía parasagital, en los territorios frontera vasculares (entre la arteria cerebral anterior y la media, o entre la cerebral media y la posterior) (*Figuras 17 y 18*). En muchos niños ambos patrones coexisten en proporción variable. En un estudio realizado por Okereafor *et al* sobre 48 RN a término con encefalopatía tras una privación aguda y total de oxígeno por un evento centinela, observaron el patrón de daño central en un 74% de los pacientes⁷⁰.

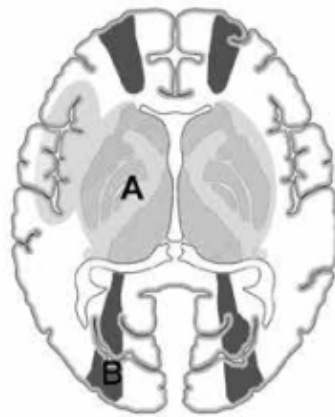


Figura 17: Patrones de daño hipóxico-isquémico: A. Patrón de daño central y B. Patrón de daño de zonas fronterizas.

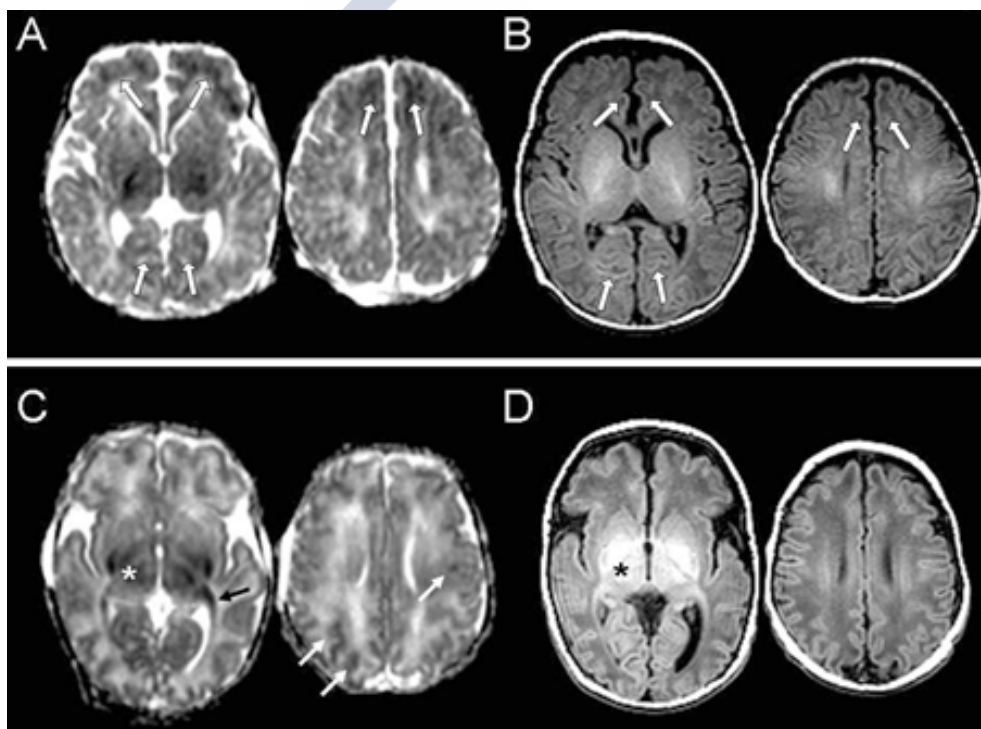


Figura 18: Patrones de daño hipóxico-isquémico en RM. RM por difusión, imágenes realizadas al 3er día del evento hipóxico-isquémico (A y C) y secuencias T1, imágenes realizadas al 10º día (B y D). En A y B se objetiva el patrón de daño de zonas fronterizas con restricción de la difusión (A, flechas) e hiperintensidades en T1 (B, flechas). En C y D se objetiva el patrón de daño central con restricción de la difusión en GB-tálamo (C, asterisco) e hiperintensidad en T1 (D, asterisco).

En condiciones normales, en la RM convencional el BPCI presenta una hiperseñal fisiológica que se pierde en las situaciones de hipoxia-isquemia (*Figura 19*).

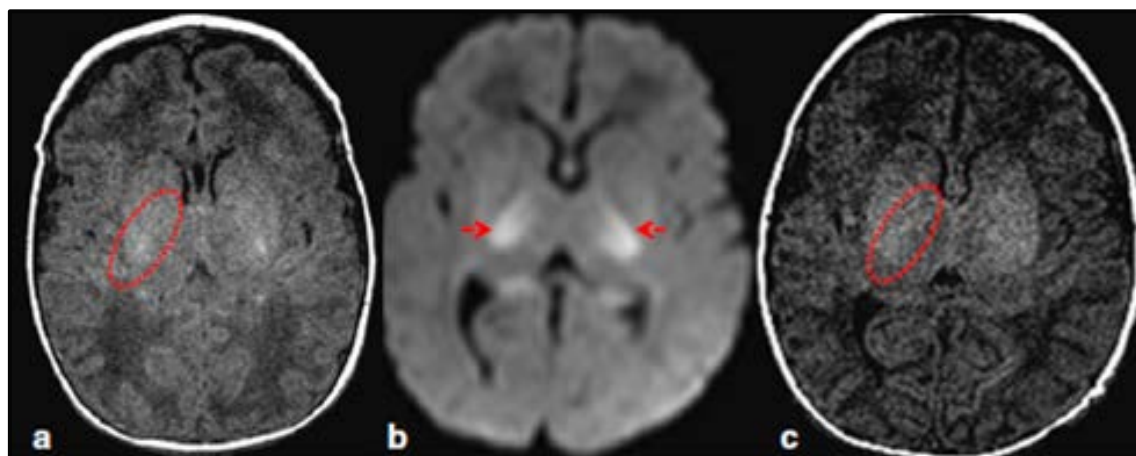


Figura 19: Imágenes de RM cerebral. Afectación del BPCI: a) Secuencia T1, hiperseñal fisiológica del BPCI (círculo). b) Secuencia de difusión, restricción de la difusión en el BPCI (flechas). c) Secuencia T1, pérdida de la hiperseñal fisiológica del BPCI (círculo).

La localización, distribución y severidad de las lesiones hipóxico-isquémicas detectadas por RM pueden ser graduadas y se correlacionan con el pronóstico a largo plazo de los pacientes. De hecho, según los hallazgos en la RM se pueden clasificar en los siguientes grados de severidad (*Tabla 7*) (*Figura 20*).

	Grado 1 (RM normal/ lesiones leves)	Grado 2 (lesiones moderadas)	Grado 3 (lesiones graves)
BPCI	Señal reducida o asimétrica	Señal reducida o asimétrica	Señal anómala o invertida
GB	Lesión focal	Lesión multifocal	Lesión difusa
Sustancia blanca	Afectación periventricular	Afectación subcortical, lesiones punctatas, infarto focal	Extensa con pérdida diferenciación sustancia blanca-gris, infartos y hemorragia
Córtex	Afectación 1-2 regiones	Afectación 3 regiones	Afectación >3 regiones

Tabla 7: Grados de severidad en RM cerebral.

(RM: Resonancia magnética; BPCI: Brazo posterior de la cápsula interna; GB: Ganglios basales)

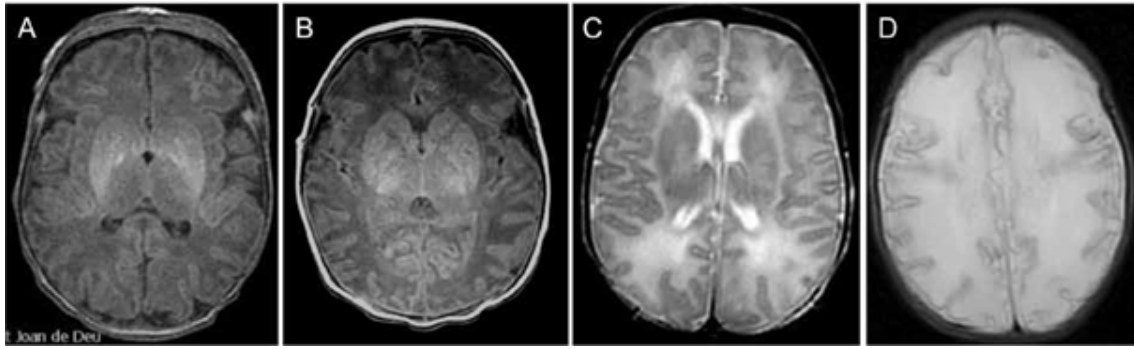


Figura 20: Grados de severidad en RM cerebral: Secuencias T1. A y B, patrón de daño central (A, daño moderado y B, daño grave). C y D patrón de daño que afecta preferentemente a corteza y sustancia blanca, especialmente en región parasagital (C, lesión moderada y D, lesión grave).

I.5.2.3. Tomografía de emisión de positrones

La tomografía de emisión de positrones (PET) es una prueba de neuroimagen útil en los pacientes con EHI, tanto en el diagnóstico como en el seguimiento, pudiendo proporcionar información pronóstica de cara al manejo de estos pacientes. Especialmente útil es la PET con fluorodeoxiglucosa que permite analizar el metabolismo de la glucosa en el tejido cerebral, que se ve alterado en las situaciones de hipoxia-isquemia.

El patrón del metabolismo de la glucosa cerebral se relaciona con la edad postconcepcional y sufre marcados cambios con el desarrollo de las distintas funciones cerebrales a lo largo del primer año de vida. Al nacimiento, los ratios más altos de metabolismo de glucosa se localizan en la corteza motora y sensorial primaria, tálamo, tronco cerebral y vermix, hipocampo/ amígdala y ocasionalmente en los GB. A los 2-3 meses de vida, el incremento del metabolismo se observa en la corteza parietal, temporal y visual primaria, en los GB y los hemisferios cerebelosos. A los 6-8 meses, las porciones inferiores y laterales de la corteza frontal son las que presentan la mayor actividad metabólica, seguidas por las regiones frontales mediales y dorsales. El patrón del adulto se consigue al año de vida aproximadamente. Estas variaciones regionales en el metabolismo de la glucosa ayudan a explicar los patrones de daño según la edad, y

que las áreas con demandas metabólicas mayores sean más propensas o vulnerables al daño⁷¹ (Figura 21).

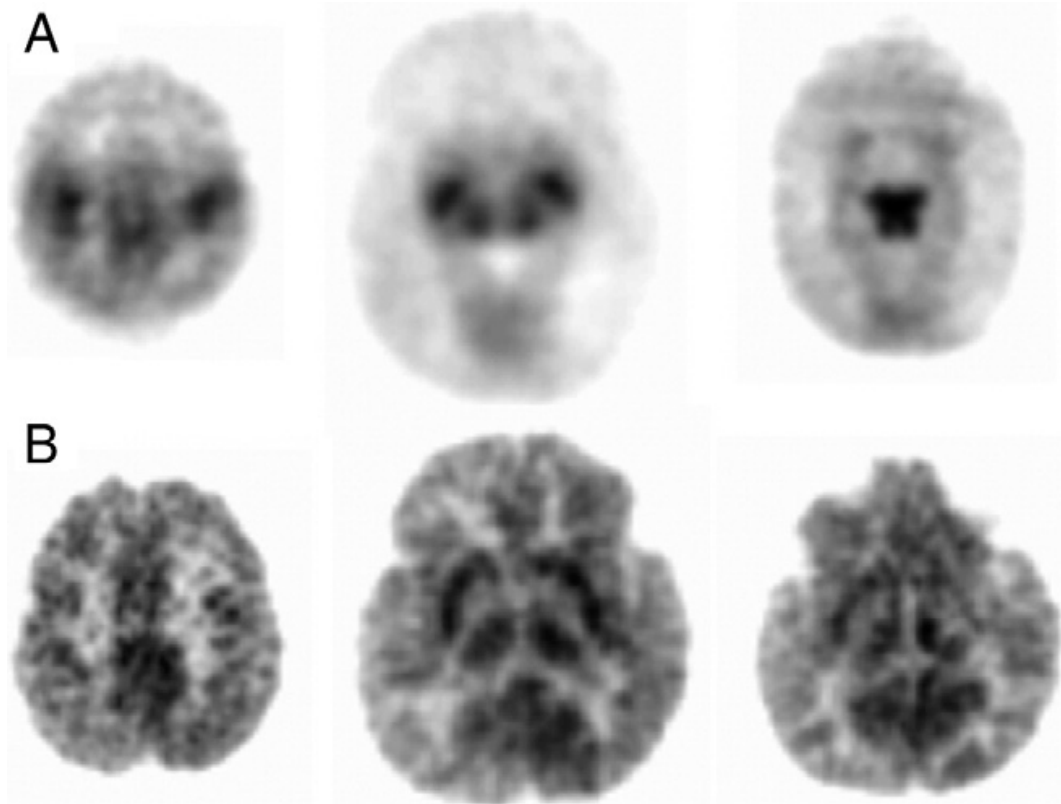


Figura 21: Metabolismo de la glucosa cerebral durante la infancia. El panel A representa el metabolismo de glucosa cerebral en un RN a término de 4 días de vida. El panel B representa el metabolismo de glucosa cerebral en un niño de 12 meses de vida. Se refleja el incremento del metabolismo en la corteza motora y sensorial primaria, tálamo, GB y tronco cerebral con disminución de la actividad en el córtex cerebral en el RN.

Se ha referido que patrones específicos de hipometabolismo pueden predecir el tipo de parálisis cerebral en la infancia⁷². El hipometabolismo talámico bilateral predice la parálisis cerebral del tipo diplegia espástica, el patrón unilateral de hipometabolismo la parálisis cerebral hemiplégica, un patrón de hipermetabolismo seguido de hipometabolismo severo de los GB y tálamo se relaciona con la parálisis cerebral distónica/ coreoatetósica y el patrón de hipometabolismo multifocal que se ve en situaciones de hipoxia-isquemia parcial prolongada se relaciona con la parálisis cerebral tipo cuadriplejía espástica.

I.5.3. Biomarcadores

I.5.3.1. Biomarcadores de daño neurológico

Los biomarcadores son moléculas liberadas por o específicamente por un órgano en particular, pudiendo dar idea sobre la fisiología o el estado patológico de dicho órgano. Pueden ser obtenidos de la sangre, la orina, el LCR o de cualquier otro fluido corporal.

Los principales biomarcadores de daño neurológico utilizados en sangre o LCR son la enolasa neuronal específica (ENE), la proteína S100B, la proteína fibrilar ácida de la glía (PFAG), la creatincinasa específica del cerebro (CK-BB) y, en orina, la S100B y el cociente lactato-creatinina. También se han descrito otros biomarcadores como son la IL-6 del cordón umbilical, la proteína básica de la mielina y la hidrolasa L1 ubiquitina carboxil-terminal (HUCT-1)⁷³ (Tabla 8).

La ENE forma parte de la familia de las enolasas, enzimas presentes en muchos tejidos y organismos con capacidad glucolítica. Las enolasas tienen varias subunidades ($\beta\alpha\gamma$) y la combinación de las mismas da lugar a diferentes isoenzimas. La enolasa 2 ($\gamma\gamma$) es la enolasa neuronal específica que se encuentra en las neuronas del sistema nervioso y en las células neuroendocrinas.

La proteína S-100B es una proteína que une calcio y el mayor componente citosólico de varios tipos de células. En particular, las células de la glía (astrocitos y oligodendrocitos) tienen una alta concentración de proteína S100B. Puede detectarse en sangre, orina, LCR, líquido amniótico, saliva y en la leche⁷⁴. La concentración de proteína S100B es superior en niños a término sanos que en los adultos y también es mayor en los prematuros que en los neonatos a término y sus niveles descienden durante los primeros 6 meses de vida. En los niños con EHI los niveles de proteína S100B son superiores en comparación con los niveles de los niños sin EHI^{75,76}.

La PFAG es una proteína filamentosa intermediaria citoesquelética de los astrocitos y solamente se libera en la sangre tras la muerte astrocitaria. Se ha visto que los niños con EHI tienen concentraciones superiores de dicha proteína que los controles⁷⁷.

En su conjunto, el biomarcador más útil es la ENE dada su especificidad del tejido

cerebral y a que se puede medir además de en LCR en sangre, seguido por la proteína S100B que también es específica del tejido cerebral y se puede medir en sangre, orina y LCR, pero puede verse alterada por otros factores como son la edad gestacional, el retraso de crecimiento intrauterino y en la trisomía 21. Ambas se relacionan con la mortalidad. Otros biomarcadores tienen un uso más limitado. Por ejemplo, la IL-6 es un marcador inflamatorio, por lo que es poco específica y la PFAG solamente se puede determinar en LCR.

Biomarcador	Categoría	Fluido de localización	Asociaciones	Utilidad
S100B	Proteína específica cerebral	Sangre de cordón, orina, saliva, leche, sangre, LCR	Embarazo complicado con restricción del crecimiento y trisomía 21. Neonatos con asfixia y EHI. Mortalidad en recién nacidos a término	++
IL-6	Marcador inflamatorio	Sangre de cordón y sangre	Neonatos con EHI	+
PFAG	Proteína específica cerebral	LCR	Neonatos con EHI	+
ENE	Proteína específica cerebral	Sangre y LCR	Neonatos con EHI, mortalidad	+++

Tabla 8: Biomarcadores de daño neurológico y su potencial uso en el daño cerebral neonatal.

(LCR: Líquido cefalorraquídeo; EHI: Encefalopatía hipóxico-isquémica; IL-6: Interleuquina-6; PFAG: Proteína fibrilar ácida de la glía; ENE: Enolasa neuronal específica)

La evaluación clínica y el aEEG pueden estar afectados por la medicación y las intervenciones terapéuticas, tales como medicación antiepiléptica, sedantes y paralizantes musculares, de aquí que los biomarcadores de daño neurológico se hayan utilizado como una estrategia adicional para evaluar la gravedad del daño y dar información sobre el pronóstico. De hecho, en los neonatos con daño cerebral, los biomarcadores pueden ser útiles para predecir el grado y localización de la lesión, estratificar el riesgo y apoyar el uso de distintos tratamientos neuroprotectivos, para monitorizar la progresión de la enfermedad y la eficacia de las estrategias

neuroprotectoras. Se ha observado una relación entre los niveles de dichos biomarcadores y la severidad de la EHI, y también incluso, entre los niveles de algunos de estos biomarcadores como los niveles de PFAG con otros indicadores de depresión y disfunción en otros órganos. Existe información limitada acerca de los niveles séricos de biomarcadores neuronales específicos en RN con EHI tratados con hipotermia. En algunos trabajos encuentran que los niveles de los biomarcadores no se modifican con la hipotermia, de hecho en el trabajo de *Chalak et al* encuentran que los niveles de HUCT-1 y PFAG no se modifican por la hipotermia y los valores más altos se obtienen de la sangre del cordón umbilical, lo que podría sugerir que el impacto del daño es predominantemente prenatal⁷⁸.

I.5.3.2. Biomarcadores de daño sistémico

Como ya se ha mencionado anteriormente, tras un evento hipóxico-isquémico además de la afectación neurológica puede producirse daño en otros órganos y sistemas. Con los análisis bioquímicos sanguíneos y urinarios, se puede valorar el daño a nivel renal, hepático y cardíaco fundamentalmente. Nos centramos sobre todo en el daño hepático que es el que más nos interesa y en el renal por ser el órgano más frecuentemente afectado.

La afectación hepática (**hepatitis hipóxica**) suele manifestarse por una elevación precoz, aguda y transitoria de las transaminasas a nivel sérico, relacionado con la muerte del hepatocito o por el incremento de la permeabilidad de membrana del mismo que permite un flujo de enzimas hacia la sangre^{59,79}. Suele tener un buen pronóstico, con un curso autolimitado y rara vez evoluciona hacia un fallo hepático fulminante. En 2009, se realizó un estudio Europeo en niños sanos hijos de madres infectadas por el virus de la hepatitis C, en los que se descartó la infección, en búsqueda de las cifras normales de GPT en niños. Se estableció que el límite superior de la normalidad para los niños <18 meses era de 60 UI/L para los niños y 55 UI/L para las niñas y en los >18 meses era 40 UI/L para los niños y 35 UI/L para las niñas⁸⁰. *Soldin et al* definen como cifras normales de gamma glutamil transpeptidasa (GGT) de 30-177 UI/L para los niños y de 23-156 UI/L para las niñas de 1-7 días de vida⁸¹. La mayoría de los autores,

consideran cifras patológicas de transaminasas cuando se supera 2 veces el límite superior considerado normal para las mismas. *Shellhaas et al* definen función hepática definitivamente anormal si durante los 3 días de hipotermia se presentan niveles de enzimas hepáticas $\geq 300\%$, y consideran cifras normales de 7-35 UI/L para la GPT y de 2-70 UI/L para la GOT⁸². De forma general, la GGT no suele verse afectada en los niños con EHI⁵⁹. A su vez, se ha demostrado en diferentes trabajos que el grado de elevación de las transaminasas se correlaciona con la gravedad de la EHI^{59,79}. Otras alteraciones sugestivas de daño hepático son la hipoalbuminemia, coagulopatía, hiperamoniemia e hiperbilirrubinemia.

El daño renal puede producirse en forma de **insuficiencia renal aguda (IRA)** manifestada por oligoanuria y/o elevación de las concentraciones de creatinina sérica. Las cifras de creatinina consideradas normales en el RN a término por *Schwartz* son de 79 $\mu\text{mol/L}$ (1,2 mg/dL) al primer día de vida y de 44 $\mu\text{mol/L}$ (0,5 mg/dL) a los 5 días de vida. Durante los 2 primeros días de vida, la creatinina sérica es un reflejo de la materna⁸³. De acuerdo con el grupo de trabajo en daño renal agudo ("*The Acute Kidney Injury Network*"), la IRA se define por un incremento en la creatinina sérica ≥ 26.4 $\mu\text{mol/L}$ (0,3 mg/dL) o por un incremento de al menos el 50% en 2 días consecutivos. Incluso *Shellhaas et al* realizaron una clasificación por estadios del daño renal agudo en las primeras semanas de vida basada en los incrementos de la creatinina sérica sobre el valor previo, de forma que hablan de Estadio 1 cuando se produce un incremento de 0,3 mg/dl o de 150 a <200%, estadio 2 con incrementos de 200 a <300% y estadio 3 con incrementos $\geq 300\%$, si el valor absoluto de creatinina es $\geq 2,5$ mg/dL o si se precisa diálisis⁸². En otros trabajos como los de *Karlowicz*⁸⁴, *Kaur*⁸⁵ y *Alaro*⁸⁶ se define la IRA por cifras de creatinina séricas superiores a 133 $\mu\text{mol/L}$ (1,5 mg/dL) a las 48 horas de vida.

A nivel cardíaco, el daño puede verse reflejado por la elevación de la creatina quinasa (CK) de origen miocárdico (CK-MB) o de la troponina cardíaca I. La CK es una enzima dimérica compuesta por dos tipos de subunidades monoméricas, M (muscular) y B (cerebral) que se combinan para formar tres isoenzimas creatina quinasa distintas: CK-1 (BB), CK-2 (MB) y CK-3 (MM). La principal proporción de la actividad total de la CK se encuentra en los músculos esqueléticos y ésta es predominantemente la isoforma CK-3, por ello las elevaciones de las concentraciones de CK son muy representativas de

daño muscular esquelético. Otros tejidos con unos niveles de CK relativamente elevados incluyen el miocardio, del cual aproximadamente el 40% es la isoforma CK-2, el tracto gastrointestinal y el cerebro, en el que predomina la isoforma CK-1. En niños sanos la CK sérica se considera normal entre 70-380 UI/L al nacimiento⁸⁷. La troponina I es una proteína que forma parte del complejo de la troponina, se une a la actina en los miofilamentos delgados con el fin de mantener unido el complejo troponina: tropomiosina. La letra I se refiere a su función inhibitoria en la unión de filamentos de actina con los de miosina, evitando la formación de puentes cruzados entre ambas y la contracción muscular. Existen tres subtipos principales de la troponina I, localizados en diferentes tejidos: la isoforma troponina I en el músculo liso de contracción lenta, denominada TNNI1, la isoforma troponina I en el músculo liso de contracción rápida, denominada TNNI2 y la isoforma troponina I cardíaca, denominada TNNI3. Diferentes estudios han sugerido una especificidad cardíaca mejorada de la troponina cardíaca I en comparación con la CKMB para la detección de lesiones de miocardio en presencia de lesiones del músculo esquelético⁸⁸ y además, aunque en pacientes asfixiados se han objetivado concentraciones superiores de CKMB que en niños normales, esta enzima no permite discriminar bien entre los niños asfixiados que tuvieron compromiso cardiovascular y los que no, no encontrando diferencias significativas en las concentraciones de CKMB entre los niños asfixiados con y sin hipotensión, entre los que tenían un electrocardiograma (ECG) normal frente a patológico y entre los que tenían fallo cardíaco y los que no⁸⁹. Por ello, para valorar la afectación cardíaca por la isquemia es más útil la troponina cardíaca I que la CKMB. Se ha objetivado que las concentraciones de troponina cardíaca I en sangre son significativamente más altas en niños que han sufrido un evento hipóxico-isquémico que en no asfícticos, tanto en los que han presentado formas de EHI como en los que han presentado hipoxia perinatal sin EHI y dichas concentraciones muestran una correlación significativa con la gravedad de la hipoxia-isquemia^{90,91}. Por ello, las concentraciones de troponina cardíaca I son un marcador precoz de hipoxia perinatal y de la severidad de la disfunción miocárdica^{92,93}. Las concentraciones que se consideran decisivas de daño miocárdico son por encima de 0,15 µg/L⁹⁴.

Además de las determinaciones bioquímicas, se puede evaluar el daño orgánico con otras pruebas complementarias, como son la ecografía renal que nos permite valorar el

tamaño y la ecogenicidad renales, el ECG que nos permite objetivar datos sugestivos de isquemia como son la depresión del segmento ST y la inversión de la onda T y la ecocardiografía que permite valorar la disfunción de la contractilidad miocárdica.

I.5.4. Saturación regional de oxígeno (rSO₂)

En los últimos años, está cobrando importancia la medición de la rSO₂ a nivel cerebral y periférico (renal, esplácnico, tisular periférico) en los pacientes con EHI. La rSO₂ se mide con un sistema de espectroscopía cercana al infrarrojo (*NIRS, del inglés Near Infrared Spectroscopy*) y refleja el flujo sanguíneo y el metabolismo de oxígeno a nivel local, al medir los cambios en la concentración de hemoglobina oxigenada y desoxigenada, es decir, se obtiene la saturación venosa mixta regional, lo cual representa el equilibrio entre el aporte y el consumo de oxígeno.

En los pacientes tratados con hipotermia se produce un incremento del flujo sanguíneo cerebral del día 1 al 2 y una disminución de la extracción de O₂, con un ratio metabólico que disminuye del día 1 al 2, por lo que la rSO₂ cerebral aumenta. No está claro si este incremento del flujo sanguíneo cerebral se debe a una normal evolución de la perfusión cerebral en paciente con EHI durante la hipotermia o es la manifestación del daño por reperfusión. A su vez, el incremento en la rSO₂ cerebral durante la hipotermia podría no diferenciar entre la extracción más baja de O₂ al tener un metabolismo cerebral menor al estar en el frío de una incapacidad para extraer el oxígeno por la muerte neuronal. En cualquier caso, se sabe que los niños con formas severas alcanzan cifras superiores de flujo sanguíneo y de rSO₂ cerebral, de forma que las alteraciones en la rSO₂ se correlacionan con la gravedad de la EHI y con el pronóstico^{82,95}.

Así es que, con las modalidades de monitorización combinadas, como es con el uso adicional de la rSO₂, lo que se pretende es proporcionar una mayor información y dar un valor predictivo pronóstico más preciso que con las estrategias aisladas⁹⁶.

I.6. MANEJO TERAPÉUTICO

La estrategia ideal sería aquella que nos permitiese reconocer a los pacientes en riesgo de sufrir un evento hipóxico-isquémico, con el fin de llevar a cabo las medidas terapéuticas oportunas y prevenir o limitar al máximo el daño. En este sentido, las mejoras acaecidas en los últimos años relacionadas con un mejor control obstétrico de las gestantes junto con los avances en los cuidados neonatales han dado lugar a una reducción del número de pacientes con EHI.

Desde un punto de vista puramente pediátrico, el manejo de estos pacientes ya se inicia en el paritorio y de forma inmediata tras el nacimiento, con una adecuada RCP. Posteriormente son fundamentales los cuidados post-reanimación, con un tratamiento de soporte general y sintomático según las manifestaciones y las complicaciones clínicas que se presenten. El único tratamiento específico que hasta la fecha ha demostrado aminorar el daño en la EHI es la hipotermia y están en desarrollo otros tratamientos neuroprotectores que en un futuro podrán mejorar las expectativas pronósticas de estos pacientes.

I.6.1. Tratamiento de soporte general

Hay que asegurar una adecuada ventilación, oxigenación y perfusión de los tejidos manteniendo la TA en rango normal, por lo que puede ser necesario soporte respiratorio (invasivo o no invasivo) o soporte inotrópico-vasoactivo. Se debe mantener un estado normoglucémico (glucemia entre 75-100 mg/dL) y evitar la sobrecarga de líquidos (riesgo de edema cerebral) y la hipertermia, de ahí la importancia de monitorizar la temperatura (T^a) en todos los RN.

La intolerancia digestiva con vómitos y/ o restos gástricos sanguinolentos es frecuente y debe valorarse la administración de algún protector gástrico. El inicio de la alimentación enteral debe demorarse durante un periodo variable acorde al estado y la evaluación clínica general y gastrointestinal.

Deben ser monitorizados electroencefalográficamente de forma continua para valorar la

existencia de crisis convulsivas. Las crisis son tratadas enérgicamente, incluso aunque no tengan correlato clínico. Pero no se recomienda el uso profiláctico de fenobarbital.

No se ha demostrado la eficacia terapéutica de intervenciones antiedema como el manitol y/o los corticoides.

I.6.2. Hipotermia terapéutica

La hipotermia sigue siendo el tratamiento de elección en la EHI, ya que ha demostrado ser un tratamiento seguro y disminuye la morbilidad en las formas moderadas o graves.

Actúa a través de distintos mecanismos:

- Reduce el metabolismo cerebral. Disminuye la utilización de energía
- Reduce/ suprime la acumulación de aminoácidos excitotóxicos y el NO
- Inhibe la cascada inflamatoria y el factor activador de plaquetas
- Suprime la actividad de radicales libres
- Disminuye el fallo energético secundario
- Inhibe la apoptosis
- Disminuye la extensión del daño cerebral

Además, otros dos aspectos que realzan su potencial utilidad clínica son que puede prolongar la duración de la ventana terapéutica y puede tener un efecto sinérgico con otras estrategias neuroprotectoras.

El tratamiento consiste en bajar de forma controlada la temperatura corporal hasta los 33,5-34,5°C (hipotermia moderada) y mantener el enfriamiento durante 72 horas, prosiguiéndose de un recalentamiento lento (sin sobrepasar los 0,5°C a la hora). Se puede realizar un enfriamiento corporal total o un enfriamiento selectivo de la cabeza. Se ha evaluado la eficacia de otras estrategias de tratamiento, con pautas más duraderas (120 horas) o de mayor enfriamiento (32°C) o ambas, pero no se ha demostrado reducir la mortalidad neonatal precoz en comparación con la estrategia clásica⁹⁷.

La máxima eficacia terapéutica de la hipotermia se obtiene cuanto antes se inicie, idealmente dentro de las primeras 6 horas de vida. Este estrecho marco de tiempo condiciona la necesidad de establecer una rápida y ordenada actuación, desde la asistencia en paritorio hasta los cuidados en la unidad de cuidados intensivos neonatales, la estabilización y la clasificación de la gravedad de la EHI y el control de los factores comórbidos que pueden agravar el daño neurológico.

Para considerar a un paciente candidato al tratamiento con hipotermia se deben cumplir estos 4 criterios⁹⁸:

1. Edad gestacional ≥ 36 semanas y ≤ 6 horas de vida (en algunos centros, consideran una edad gestacional ≥ 35 semanas y hasta 8 horas de vida si se ha realizado hipotermia pasiva)
2. $\text{pH} \leq 7,0$ o un déficit de bases ≥ 16 mmol/L en una muestra de sangre umbilical u obtenida en la primera hora de vida
3. Apgar score < 5 a los 10 minutos de vida o RCP prolongada (ventilación asistida, compresiones torácicas o medicaciones) iniciada al nacimiento y continuada al menos durante 10 minutos
4. Encefalopatía moderada a severa en el examen clínico

Algunos efectos adversos descritos con el tratamiento con hipotermia son el aumento de la viscosidad sanguínea, acidosis metabólica, disminución de la disponibilidad de oxígeno, incremento del potasio extracelular, arritmias cardíacas, alteración de la coagulación, disfunción plaquetaria y síndrome coreico.

Tres son los ensayos clínicos principales que han mostrado la eficacia de la hipotermia midiendo como variable primaria compuesta mortalidad y discapacidad mayor en la EHI (el CoolCap basado en un enfriamiento selectivo de la cabeza y NICHD y TOBY con enfriamiento corporal total)⁹⁹⁻¹⁰¹. El último publicado es el TOBY que también encuentra mejoría en distintas variables secundarias neurológicas a los 18 meses en los pacientes asfícticos supervivientes. Esta aparente eficacia y seguridad observada, ha sido ratificada también en otros ensayos clínicos y en diferentes metaanálisis¹⁰²⁻¹⁰⁸. En todos ellos, se concluye que esta intervención es eficaz para reducir la prevalencia de

muerte-discapacidad asociada a la EHI moderada-grave; que el número de neonatos con EHI que precisan ser tratados para prevenir un caso de muerte o discapacidad está en un rango de 6 a 9 pacientes; y que es una intervención terapéutica segura, sin riesgo relevante para el niño siempre que se aplique en unidades de nivel III y siguiendo protocolos estrictos de enfriamiento y recalentamiento. En el año 2010, se publicó en el *British Medical Journal* un nuevo metaanálisis¹⁰⁹ basado en los resultados de los 3 principales ensayos clínicos referidos anteriormente, mostrando una reducción del riesgo combinado de mortalidad y de secuelas neurológicas a los 18 meses en los pacientes tratados con hipotermia frente a los pacientes en normotermia. También vieron que la reducción de estos eventos adversos era de mayor grado en el subgrupo de EHI moderada (RR: 0,73; IC 95%: 0,58 a 0,92) que en el de EHI grave (RR: 0,87; IC 95%: 0,75 a 1,01). Valoraron igualmente otros resultados secundarios, como que con la hipotermia se incrementa el número de pacientes que sobreviven con una función neurológica normal (definida como supervivencia sin parálisis cerebral y con un índice de desarrollo mental superior a 84, un índice de desarrollo psicomotor superior a 84 y visión y audición normales), con un número de pacientes necesario tratar de 8, es decir, que se necesitan tratar 8 pacientes con hipotermia para que en 1 de ellos la función neurológica sea normal.

Los beneficios de la hipotermia también se pueden ver reflejados a nivel de la neuroimagen. Así es que, en la era prehipotermia un 30% de los pacientes con EHI tenían una RM normal, mientras que en la era posthipotermia este porcentaje asciende hasta un 41-54%^{110,111}. En la *Figura 22* puede verse reflejado en RM convencional y en difusión la progresión del daño neurológico en los días 1, 3 y 10 de evolución en pacientes con EHI tratados con hipotermia frente a pacientes en normotermia. Fíjense como las alteraciones se pueden apreciar más precozmente en la RM por difusión, objetivándose la mayor afectación en la RM convencional en el día 10 y como las lesiones son menores en los pacientes tratados con hipotermia (en el día 10, se ve una afectación leve en los GB representada por hiperintensidad en T1 y el mapa de difusión es normal)¹¹². Aún así, se precisan más estudios que evalúen la verdadera influencia de la hipotermia sobre los hallazgos de la RM.

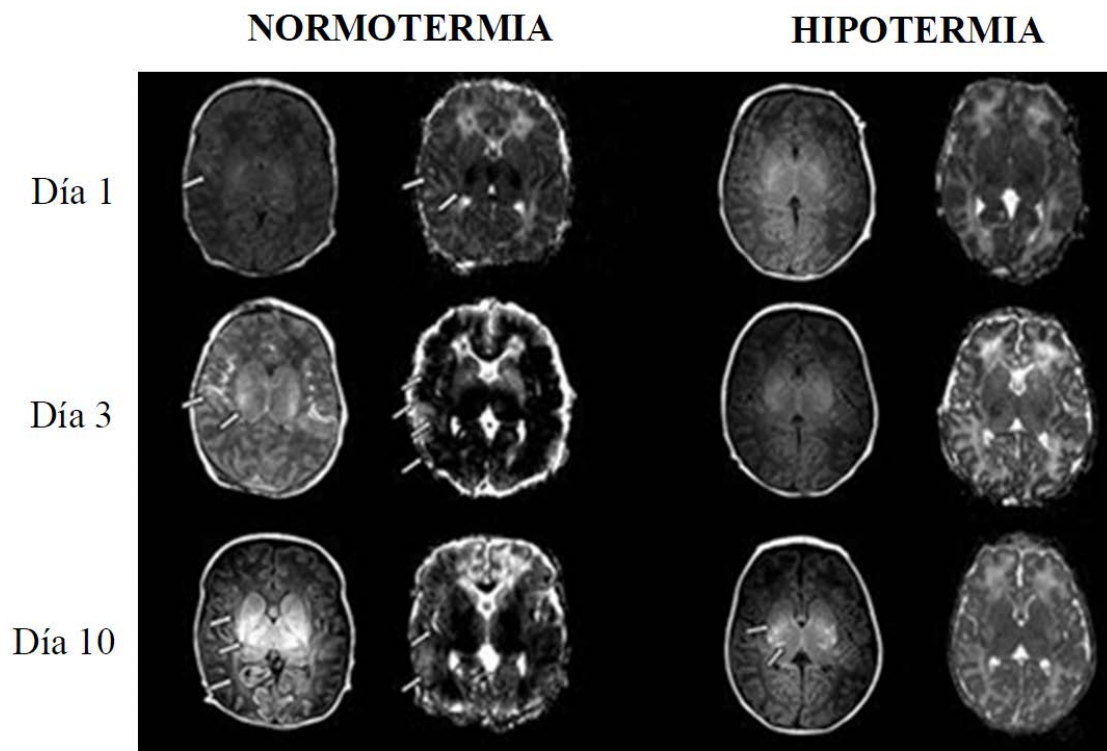


Figura 22: Progresión del daño neurológico en RM convencional y en difusión en los días 1, 3 y 10 en pacientes con EHI en normotermia y tratados con hipotermia.

Ahora bien, a pesar de los avances en el tratamiento, hasta un 40% (entre un 30 y un 70% para algunas series) de los tratados con hipotermia fallecen o quedan con secuelas neurológicas graves^{100-102,113-117}.

I.7. PRONÓSTICO Y FACTORES PRONÓSTICOS

Existen múltiples factores que van a condicionar el pronóstico de los pacientes con EHI. Entre ellos, el grado de encefalopatía y el manejo terapéutico son unos de los más importantes. Se sabe que dejada a su evolución natural, la progresión de la EHI muestra un perfil dinámico. En general, en las formas leves y moderadas el cuadro clínico comienza a mejorar progresivamente después de las 72 horas de vida. En las formas graves, entre las 24 y 72 horas parece agudizarse el deterioro de la capacidad para despertar y con frecuencia aparece disfunción del tronco encefálico. Es en este periodo

cuando habitualmente fallecen y los que sobreviven, experimentan una progresiva mejoría en la vigilia, el tono cambia desde la hipotonía a distonía o hipertonía extensora y puede aparecer una combinación de parálisis bulbar y pseudobulbar que determina problemas en la alimentación. Hoy en día, gracias a la inclusión de estos pacientes en el tratamiento con hipotermia, se ha conseguido mejorar el pronóstico tanto a corto como a largo plazo, pero todavía un porcentaje no desdeñable de pacientes fallecen o quedan con secuelas importantes.

Dentro de los factores reconocidos con valor pronóstico cabe destacar los siguientes:

I.7.1. Clínica

El grado de encefalopatía clínica en el periodo neonatal ha sido la principal aproximación utilizada para predecir la evolución de los niños con EHI. Estudios en los años 70 y 80 del siglo pasado mostraron de forma consistente que la inmensa mayoría de los niños con EHI leve tenían un riesgo muy bajo de presentar alteraciones graves del neurodesarrollo; mientras que los niños con EHI grave casi invariablemente fallecían en el periodo neonatal o tras el alta, o presentaban alteraciones significativas como parálisis cerebral grave, déficit cognitivo y epilepsia. De hecho, con la escala de Sarnat se aceptaba que el 98% de los neonatos que presentan un compromiso leve tenían un buen resultado neurológico y que el 96% de los que presentaban compromiso severo tenían un resultado pobre. Por otro lado, el pronóstico de los niños con EHI moderada ha sido siempre mucho más variable y difícil de predecir¹¹⁸.

Todos estos datos acerca del valor predictor de la gravedad de la EHI proceden fundamentalmente de la etapa previa al tratamiento con hipotermia, cuando la gravedad era establecida de acuerdo a su máxima expresión en los primeros días de vida. Pero en la actualidad, con el acceso al tratamiento con hipotermia, la gravedad de la EHI tiene que establecerse precozmente, en las primeras 6 horas de vida y este tratamiento consigue mejorar el pronóstico independientemente de la severidad de la EHI con respecto a los pacientes no incluidos en hipotermia¹¹⁹. De forma que, en la era de la hipotermia, los mejores predictores de resultados adversos son la severidad de la EHI en

las primeras horas de vida (a mayor gravedad peor pronóstico) y la persistencia de la gravedad (si persiste la gravedad peor pronóstico). En el *estudio Coolcap*, se objetivó que la EHI severa persistente a las 72 horas se asoció con muerte y discapacidad severa en el 89% de los pacientes del grupo enfriado y en el 100% de los pacientes del grupo no enfriado. En contraste, los niños del grupo enfriado con EHI moderada persistente a las 72 horas tuvieron mejores resultados que los niños del grupo no enfriado, con resultados favorables en el 69% de los pacientes del grupo enfriado comparado con el 36% de los pacientes del grupo no enfriado¹²⁰. Además del grado de afectación clínica y la persistencia de la gravedad, la presencia de signos de alarma previos al alta hospitalaria también son indicadores de mal pronóstico. Los principales signos de alarma se pueden ver descritos en la *Tabla 9*.

Variables	Respuestas óptimas	Signos de alarma
Perímetro cefálico	Mismo percentil que el peso	Crecimiento cefálico inferior al percentil de nacimiento
Suturas craneales	En contacto (<5 mm)	Cabalgamiento o cresta en las suturas
Seguimiento visual	Capta y sigue el estímulo	Pobre orientación visual (o auditiva)
Interacción social	Receptivo	Ausente o irritabilidad constante
Reflejo de succión y alimentación oral	Rítmico y eficaz. Capaz de alimentarse por boca	Succión débil, irregular o pobre coordinación succión-deglución. No alimentación oral
Tono cervical	Balance entre músculos flexores y extensores	Marcado rezago de la cabeza o “retrocollis”
Tono axial	Más flexión que extensión	Hiperextensión o marcada hipotonía
Dedos y pulgares	Movimientos independientes y abducción del pulgar	Manos fuertemente cerradas. No abducción del pulgar o primer dedo del pie hiperextendido
Movimientos generales	Fluidos, variables y complejos	Sin variabilidad, fluidez, ni complejidad. Se mueve en bloque o da sensación de rigidez
Reflejos miotáticos y reactividad	Reflejos fáciles de obtener	Franca hiperreflexia, clono, temblor o sacudidas al menor estímulo

Tabla 9: Signos clínicos de alarma previos al alta hospitalaria en pacientes con EHI.

Hay que tener en cuenta que esta aproximación al pronóstico neuroevolutivo tiene algunas limitaciones: en primer lugar, la graduación de la gravedad clínica de la EHI no siempre es fácil, especialmente si el RN está recibiendo o ha recibido medicación antiepiléptica o sedoanalgesia. Además, las clasificaciones de gravedad de la encefalopatía utilizadas en los diferentes estudios no son uniformes, lo que da lugar a solapamientos entre las categorías de leve-moderada, e incluso entre las categorías de moderada y grave; en segundo lugar, deja a los niños con EHI moderada con un pronóstico demasiado incierto; y en tercer lugar, estudios a largo plazo muestran que los RN con EHI leve, tradicionalmente considerados «sin riesgo» y por tanto muchas veces no incluidos en programas de seguimiento, tienen una tasa de alteraciones en el desarrollo más alta de lo que se había considerado hasta ahora. Estas alteraciones incluyen problemas motores finos en ausencia de parálisis cerebral, trastornos neuropsicológicos y de memoria, problemas del comportamiento (especialmente problemas de atención y de integración social), así como necesidades educativas especiales^{121,122}.

I.7.2. EEGa

En la era previa al tratamiento con hipotermia, numerosos estudios demostraron que el EEGa es un excelente predictor precoz de los resultados en la EHI, con una sensibilidad del 93% y una especificidad del 91% realizado en las primeras 24 horas y con un valor predictivo positivo (VPP) para predecir la muerte o discapacidad superior al 80%. En la evolución natural de la EHI, se puede apreciar como el EEGa se modifica durante los primeros días tras la asfixia dependiendo de la duración y la severidad del insulto. En las formas leves rápidamente se normaliza (en menos de 6-12 horas) y el pronóstico es bueno. Los pacientes con un EEGa con actividad suprimida (de bajo voltaje o plano) más allá de las 24 horas tienen un pronóstico malo, con altos ratios de muerte o alteraciones neurológicas severas. Mientras que como en el caso de la clínica, los pacientes con alteraciones electroencefalográficas consideradas de valor intermedio (voltaje moderadamente anormal, brote-supresión) tienen un pronóstico más variable¹²³.

Ahora bien, el valor pronóstico del EEGa en los pacientes con EHI sometidos a

tratamiento con hipotermia es diferente. El VPP del EEGa con menos de 6 horas de vida en los pacientes enfriados es aproximadamente un 25% más bajo que en los pacientes no enfriados^{124,125}. Su valor pronóstico en horas de vida está retrasado, mientras que el máximo valor en pacientes no enfriados se obtiene con 24 horas de vida, en pacientes enfriados se retrasa a las 48 horas y como el tratamiento con hipotermia modifica los registros electroencefalográficos, es la progresión evolutiva de los trazados lo que determina fundamentalmente el pronóstico. Se consideran datos de mal pronóstico asociados a muerte o secuelas neurológicas graves la presencia y duración prolongada de las crisis convulsivas, sobre todo el estado convulsivo, la ausencia persistente de ciclos de sueño-vigilia por encima de las 36-72 horas de vida y la persistencia de registros patológicos (brote-supresión, continuo de bajo voltaje, plano) más allá de las 48-72 horas. Mientras que, la recuperación precoz del trazado, antes de las 12 horas o al menos antes de las 36 horas, se asocia con resultados normales o con alteraciones menores. Así es que, el EEGa es una de las mejores evaluaciones pronósticas durante las primeras 48 horas de vida^{119,125}.

Existen otras pruebas neurofisiológicas que pudieran tener utilidad clínica y pronóstica en los pacientes con EHI. En el trabajo de *Van Laerhoven et al*, se refiere que el EEG tiene una sensibilidad pronóstica del 0,92 y una especificidad del 0,83 y los potenciales evocados visuales (PEVi) de 0,90 y 0,92 respectivamente¹²⁷. Algunos autores^{128,129} defienden que los potenciales somatosensoriales son el mejor indicador simple del pronóstico precoz en adultos en coma postraumático o post-hipoxia-isquemia en comparación con la escala de coma de Glasgow, el TC y el EEG. En recién nacidos con EHI, estudios previos^{130,131} mostraron que los potenciales somatosensoriales tenían un VPP del 73-100% para pronosticar los resultados a corto plazo. *Suppiej et al*¹³² mostraron que la combinación de la aplicación de los PEV y los somatosensoriales era el método de elección para establecer el pronóstico neuroevolutivo del RN a término, sobre todo en los casos de EHI moderada. *Trollmann et al*¹³³, en su trabajo concluyeron que los potenciales somatosensoriales tienen un valor adicional para el diagnóstico precoz de EHI, pero no utilidad en el pronóstico a largo plazo.

Con todo ello, por el momento, la prueba neurofisiológica de mayor valor pronóstico sigue siendo el EEGa y se precisan estudios adicionales que clarifiquen el papel pronóstico de otras pruebas neurofisiológicas en los niños tras la asfixia perinatal¹³⁴.

I.7.3. Neuroimagen

Los hallazgos en la ecografía cerebral y en Eco-doppler también se relacionan con el pronóstico. La ecografía convencional tiene escaso valor pronóstico en las primeras horas de vida, pero la presencia de edema cerebral, daño en el tálamo y en los GB, en el cerebelo y en el tronco encefálico se asocia con un peor pronóstico fundamentalmente si persiste tras 2 días. El IR doppler ≤ 0.55 entre las 24 y 72 horas tiene un elevado VPP de resultados anormales y predice un pronóstico adverso con una sensibilidad del 100% y una especificidad del 81%¹³⁵. Así es que, en el estudio de *Kudreviciene et al*, se encontró una relación entre resultados adversos a nivel psicomotor y en el desarrollo mental en aquellos niños que presentaban lesiones más extensas cerebrales en la ecografía y con un patrón en eco-doppler consistente en IR bajo en la arteria cerebral media y anterior¹³⁶. Ahora bien, también el VPP del IR se ve modificado por la hipotermia y es considerablemente menor en los pacientes con hipotermia que en los pacientes no enfriados.

Como ya se ha mencionado previamente, la prueba de neuroimagen de elección en pacientes con EHI es la RM y se recomienda realizarla como herramienta pronóstica durante el primer mes de vida (entre los 8 y 30 días) en RN con formas moderadas o graves y en aquellos pacientes en los que se planteen dudas pronósticas o sean necesarias pruebas para orientar decisiones médicas, como la adecuación del esfuerzo terapéutico, se sugiere realizar una RM cerebral precoz en la primera semana de vida⁶⁰.

La alteración de la difusión en RM tiene alto VPP de resultados adversos y los hallazgos normales en la RM convencional T1/T2 un alto VPP de resultados favorables¹²⁷. A su vez, el pronóstico va a depender de la localización, extensión y gravedad de la afectación (*Tabla 10*). La pérdida de la hiperintensidad en el BPCI a la edad del término, predice un resultado anormal al año de vida (muerte o discapacidad neurológica significativa) con una especificidad y VPP del 100%. De hecho, la intensidad de la señal del BPCI es uno de los mejores factores predictores del desarrollo motor y de la capacidad para andar a la edad de 2 años. Una intensidad anormal del BPCI, con frecuencia presente en el daño ganglio-talámico moderado o grave, se correlaciona casi invariablemente con parálisis cerebral. Por el contrario, la intensidad normal, generalmente observada en ausencia de lesión ganglio-talámica o en lesiones

leves, es predictora de un desarrollo motor normal. Las lesiones en la región gangliotalámica se asocian también con la parálisis cerebral, y hasta un 50-75% de los supervivientes con lesión gangliotalámica la presentan. El tipo de parálisis cerebral más frecuente es la discinética, que se acompaña en un porcentaje significativo de casos de alteraciones oromotoras que producen dificultades en la alimentación y en el lenguaje hablado. El daño gangliotalámico se ha asociado también con déficits motores menores en ausencia de parálisis cerebral en la edad escolar. Los RN con lesión aislada de la corteza y sustancia blanca tienen un pronóstico mucho más favorable desde el punto de vista motor. El riesgo de parálisis cerebral en estos niños es inferior al 10% y, además, en la mayoría de los casos el trastorno motor es leve y permite una deambulación independiente. Estos niños, sin embargo, tienen una alta frecuencia de problemas cognitivos y conductuales, que se manifiestan preferentemente después de los dos años de edad. Estos pacientes también tienen un riesgo incrementado de problemas visuales y de desarrollar epilepsia. La lesión del tronco cerebral condiciona sobre todo trastornos de alimentación, con la necesidad de colocación de una gastrostomía en muchos pacientes^{70,137-140}.



BRAZO POSTERIOR CÁPSULA INTERNA (BPCI)	
Gravedad lesión	Riesgo parálisis cerebral
Señal equívoca	30-60% (Parálisis cerebral leve)
Señal anómala	70-80% (Parálisis cerebral grave)
CORTEZA	
Epilepsia	
GANGLIOS BASALES Y TÁLAMO (GBT)	
Gravedad de la lesión	Riesgo de parálisis cerebral
Leve	10-15%
Moderada	50-75%
Grave	>95%
TRONCO ENCEFÁLICO	
Signo	Consecuencias
Alteración de la señal en el tronco	Trastornos alimentación, necesidad de gastrostomía (lesión protuberancial). Aumento de la mortalidad
SUSTANCIA BLANCA	
Lesión	Riesgo
Grave (sin lesión GB ni tálamo)	30-40% Retraso cognitivo 5-10% Parálisis cerebral (leve)

Tabla 10: Pronóstico de los pacientes con EHI según la localización, extensión y gravedad de las lesiones objetivadas por RM cerebral.

I.7.4. Biomarcadores de daño neurológico

Existen resultados contradictorios en cuanto al valor pronóstico de los biomarcadores de daño neurológico, pues muchos de ellos no son específicos del daño hipóxico-isquémico, el momento óptimo para medirlos no es bien conocido y los puntos de corte para considerar cifras patológicas no están bien establecidos.

Celtik et al objetivaron que valores superiores a 40 µg/L de ENE sérica obtenidos entre 4 y 48 horas después de la agresión hipóxico-isquémica tenían un elevado valor predictivo en la severidad de la EHI, pudiendo distinguir niños sin EHI o con formas leves, de niños con formas moderadas o graves. *Celtik et al* también observaron que cifras superiores a 45,4 µg/L permitían diferenciar niños con malos resultados de niños con resultados favorables¹⁴¹.

Otros estudios correlacionaron los niveles de S100B con los resultados de la EHI en una relación directa, de forma que a mayores cifras mayor posibilidad de formas moderadas o severas y muerte. *Quian et al* establecieron el punto de corte en 2,02 µg/L para la S100B sérica¹⁴², *Gazzolo et al* en 0,41 µg/L para la S100B urinaria¹⁴³ y *Risso et al* en 1µg/L a nivel urinario, quienes demostraron también que la concentración urinaria de la proteína S100B no se ve afectada por el fallo renal y que la sensibilidad y especificidad se incrementan cuando las muestras de orina se toman entre las 4 y las 72 horas tras el nacimiento¹⁴⁴.

En otros estudios también se observó relación entre otros biomarcadores y la severidad y el pronóstico de la EHI. *Enner et al*¹⁴⁵ vieron que los cambios temporales en PFAG y sus niveles se relacionaban con la severidad de la EHI y con el pronóstico. De hecho, refieren que niveles límite de 0,08 ng/ml al ingreso permiten distinguir neonatos con formas de EHI moderadas a graves de niños sin EHI y que límites de 0,15 ng/ml al ingreso identifican bien a los niños que presentarán daño cerebral en la RM. *Massaro et al*¹⁴⁶ hallan una relación entre los niveles elevados de PFAG a las 24 y 72 horas y los resultados adversos en niños con EHI tratados con hipotermia en comparación con los controles.

Recientemente se ha descrito que la evolución de los niveles séricos de S100B y ENE basales y a las 72 horas en pacientes tratados con hipotermia tiene una gran utilidad pronóstica y que la ENE en el LCR es la determinación que presenta la mejor capacidad predictiva pronóstica¹⁴⁷. De aquí que, en los RN con EHI, estables y sin coagulopatía refractaria, se podrá considerar la determinación de ENE en LCR en las primeras 72 horas de vida, particularmente si se precisa información adicional para establecer el pronóstico o tomar decisiones de limitación del esfuerzo terapéutico.

I.7.5. Biomarcadores de daño sistémico

En diferentes estudios se ha encontrado una relación entre el grado de afectación sistémica medida por parámetros bioquímicos y la severidad de la EHI, pero no con los resultados a largo plazo. De hecho, *Mathias et al*, *Shellhaas et al* y *Chhavi et al* observan una relación entre los niveles de transaminasas y el grado de EHI^{59,79,82}.

I.7.6. Saturación regional de oxígeno (rSO2) cerebral y sistémica

En los últimos años, se está analizando el valor pronóstico de otros parámetros que se están empezando a emplear en los pacientes con EHI, como es el caso de la rSO2. Los cambios en el metabolismo cerebral de oxígeno se han propuesto como biomarcadores de daño cerebral en la EHI y estos cambios se pueden monitorizar con un sistema de espectroscopía cercana al infrarrojo, reflejándose el flujo sanguíneo y el metabolismo de oxígeno cerebral. Este sistema también puede ser empleado para medir la perfusión a nivel renal, esplácnico y a nivel tisular periférico. En varios estudios se ha objetivado una relación entre las alteraciones en la rSO2 cerebral y el grado de EHI con rSO2 cerebrales más altas en las formas más graves, pero no con los resultados a largo plazo. Sin embargo, sí se ha encontrado una relación entre las alteraciones en la rSO2 sistémica y los resultados a largo plazo, de forma que los pacientes con rSO2 sistémicas más bajas tienen un peor pronóstico y los valores más altos a las 48-72 horas se asocian con mejores resultados a los 18 meses^{82,95,96} (*Figura 23*).

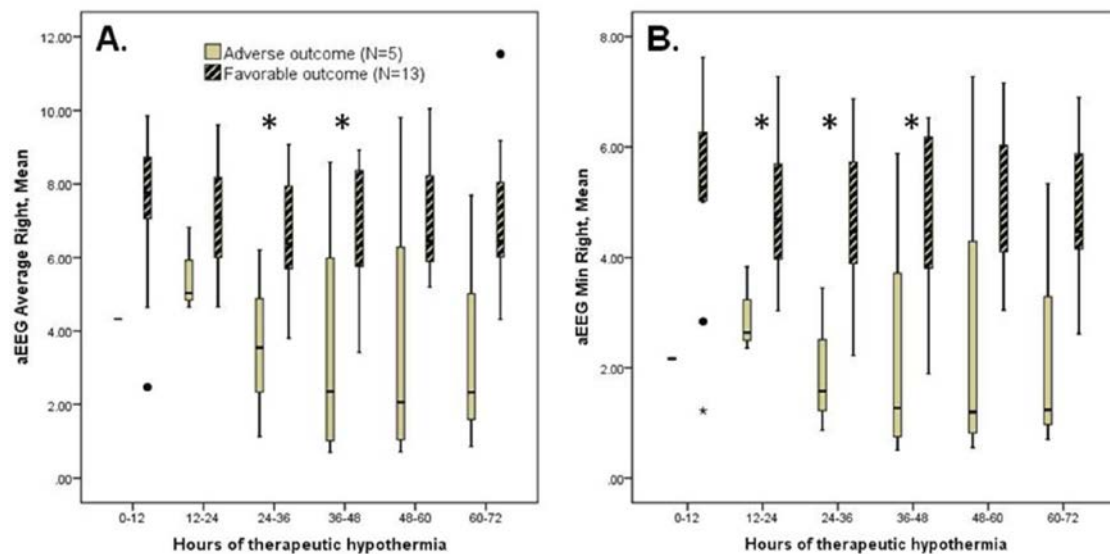


Figura 23: Comparación entre las rSO2 cerebrales y sistémicas en las primeras 72 horas de vida en pacientes con EHI tratados con hipotermia y los resultados a los 18 meses de vida. Imagen autorizada y tomada de *J Child Neurol* 2015; 30: 1526-31.

(rSO2: Saturación regional de oxígeno)

I.7.7. Otros factores pronósticos y resumen

Es fundamental el control de los **factores comórbidos** en los pacientes con EHI para limitar y evitar contribuir al daño, lo que tendrá una influencia significativa en el pronóstico.

Un factor que influye positivamente en el pronóstico es el poder ofrecerles a estos pacientes el tratamiento con **hipotermia**. Hoy en día no estaría justificada la falta de acceso a esta terapéutica. En el metaanálisis de *Tagin et al* de 2012 se evaluaron los resultados en 1214 RN con EHI moderada a severa incluidos en hipotermia en las primeras 6 horas de vida y se observó lo siguiente¹¹⁵:

- A la edad de 18 meses, la hipotermia comparada con los cuidados rutinarios supuso una reducción en los resultados de muerte y discapacidad neurológica mayor (48 vs 63%).
- En el subgrupo analizado, el beneficio de la hipotermia para reducir la muerte o la

discapacidad neurológica mayor fue estadísticamente significativo para los RN tanto con formas moderadas como graves de EHI.

- Para lograr evitar una muerte o alteración neurológica mayor el número de niños necesarios tratar afectados de EHI moderada fue de 6 y de EHI severa 7.
- La reducción del riesgo de muerte o discapacidad neurológica mayor se objetivó para ambas modalidades de hipotermia (enfriamiento corporal y enfriamiento selectivo de la cabeza).
- La hipotermia incrementa la supervivencia con un resultado neurológico normal a los 18 meses (40 vs 24%).

También se han publicado algunos estudios en los que se evidencia el efecto beneficioso de la hipotermia más a largo plazo. *Shankaran et al*, mostraron que la proporción de muertes o coeficientes de inteligencia (CI) <70 a la edad de 6-7 años fue menor en niños asignados al grupo de hipotermia comparado con el grupo control (47 vs 62%)¹⁴⁸. En el ensayo clínico TOBY, la proporción de niños que sobrevivieron a la edad de 6-7 años con CI ≥ 85 fue significativamente más alto en el grupo de hipotermia comparado con el grupo control (52 vs 39%)¹⁴⁹.

En la *Figura 24* se hace un resumen de los principales factores pronósticos en la EHI que nos facilitan la realización de una aproximación pronóstica rápida en cada paciente, de cara a dar una información más precisa a la familias y también reconocer aquellos pacientes con alto riesgo de pronóstico adverso que en un futuro pudieran beneficiarse de otros tratamientos junto a la hipotermia.

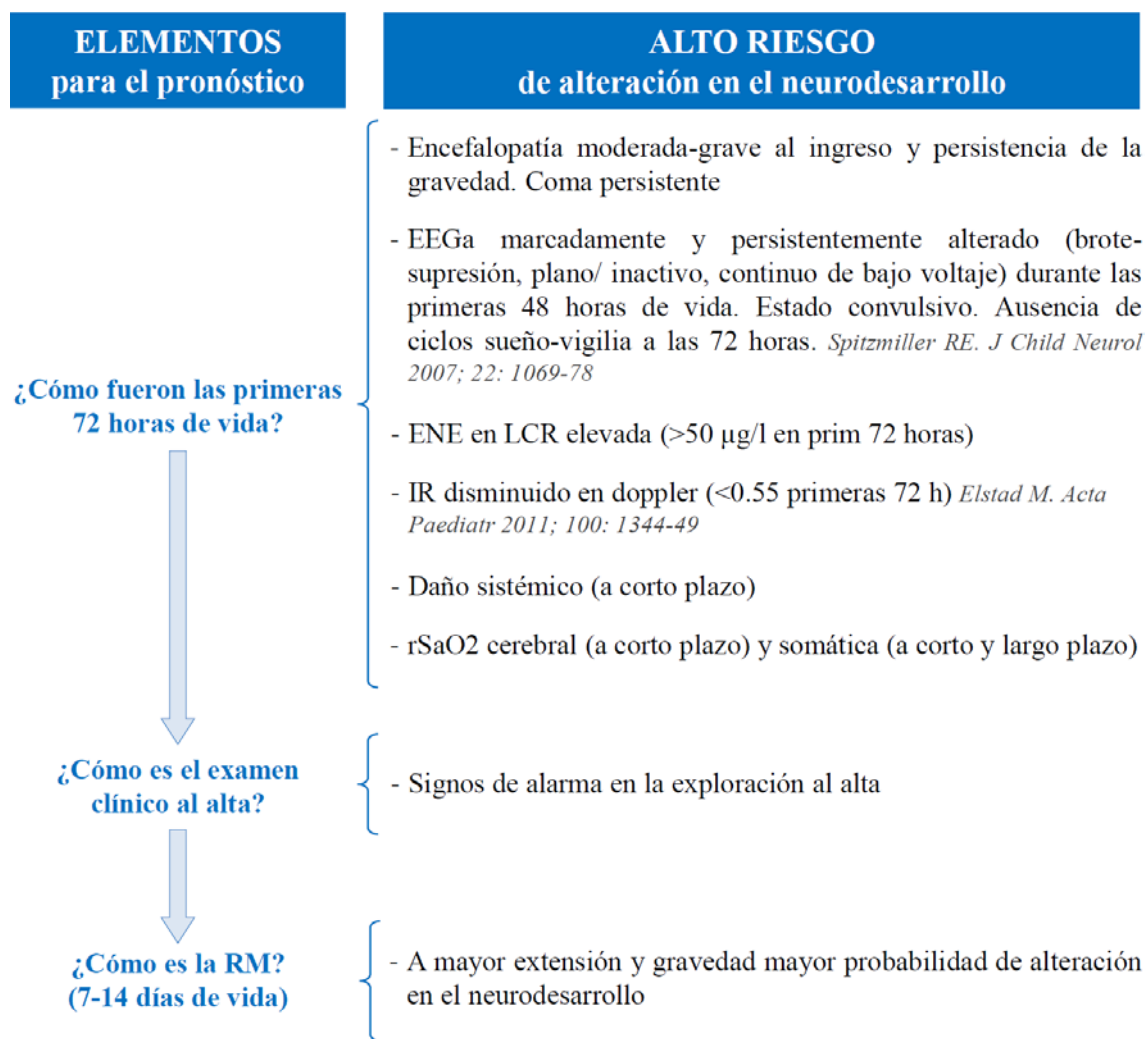


Figura 24: Resumen de los principales factores pronósticos en EHI.

(EEGa: Electroencefalograma integrado por amplitud; ENE: Enolasa neuronal específica; LCR: Líquido cefalorraquídeo; IR: Índice de resistencia; rSaO2: Saturación regional de oxígeno; RM: Resonancia magnética)

I.8. EVALUACIÓN Y SEGUIMIENTO A LARGO PLAZO

La planificación y duración del seguimiento en el RN con EHI perinatal debería hacerse de forma individualizada, atendiendo tanto a factores de riesgo biológico (gravedad de la encefalopatía, tipo de lesión cerebral) como a factores familiares y sociales. Los niños con EHI moderada o grave deben ser atendidos en un centro hospitalario con acceso al

tratamiento con hipotermia y a las diferentes pruebas pronósticas señaladas anteriormente. La programación de las evaluaciones debería hacerse teniendo en cuenta la edad de aparición de cada una de las complicaciones y el riesgo específico que tiene cada niño de presentarlas. Dada la diversidad y complejidad de los problemas que se presentan tras el alta hospitalaria, la atención a estos niños precisa un abordaje multidisciplinar. Los niños con elevado riesgo de fallecimiento tras el alta hospitalaria, así como sus familias, precisan una atención especial dirigida a anticipar las complicaciones que conducen al fallecimiento, optimizar los cuidados al final de la vida y atender las necesidades familiares en relación al duelo.

Ahora bien, ante cualquier RN que presente al nacimiento una situación de riesgo de daño neurológico, independientemente de la gravedad de la afectación, el seguimiento clínico debe ser estrecho y con una exploración física minuciosa. Existen diferentes escalas útiles que nos permiten valorar el desarrollo neurológico en estos pacientes.

La *tabla de desarrollo Haizea-Llevant*¹⁵⁰ es el resultado de dos programas, el Estudio Llevant y el Programa Haizea, cuyos datos de referencia se obtuvieron de una muestra representativa de niños de Cataluña y el País Vasco. Permite obtener información del desarrollo cognitivo, social y motor de los niños entre 0 y 5 años de vida. Incluye 97 indicadores distribuidos en las siguientes áreas: socialización (26 ítems), lenguaje y lógica-matemática (31 ítems), manipulación (19 ítems) y postural (21 ítems). En cada área se indica la edad en que lo ejecutan el 50, 75 y 95% de la población infantil.

La *escala de desarrollo psicomotor de la primera infancia de "Brunet-Lezine"*¹⁵¹ permite hacer una valoración del desarrollo de los niños entre los 0 y 30 meses de vida, aunque ha sido ampliada hasta los 6 años. Explora cuatro áreas con 10 ítems en cada una: control de la postura, coordinación óculo-motriz, lenguaje/ comunicación y sociabilidad/ autonomía. Permite obtener una edad de desarrollo y un cociente de desarrollo global del niño, así como una valoración parcial de la edad de desarrollo y del cociente de desarrollo del niño en cada una de las áreas exploradas.

La escala que actualmente presenta el mayor reconocimiento a nivel internacional es la *Escala Bayley III de desarrollo infantil*, gracias a sus excelentes propiedades psicométricas y a su sistema de puntuación cuantitativo¹⁵². Esta escala valora globalmente las áreas evolutivas más importantes, permitiendo determinar de forma

simple y precisa el nivel de desarrollo infantil, así como identificar tempranamente retrasos del desarrollo y obtener información válida para planificar la intervención. Esta escala es una revisión de las *Bayley Scales of Infant development- Second Edition* (BSID-II; Bayley, 1993). Es un instrumento de referencia a nivel internacional que se aplica individualmente y permite la evaluación del desarrollo en sus primeras etapas en niños entre 1 y 42 meses de edad. Evalúa el desarrollo en tres dominios: cognitivo, lenguaje, incluyendo comunicación expresiva y receptiva y motor, incluyendo motricidad fina y gruesa, mediante la aplicación de una serie de ítems al niño. También evalúa el comportamiento del niño durante la evaluación y en el hogar mediante un “Inventario de observación conductual”, que cumplimentan tanto el examinador como el cuidador y que sirve de ayuda para la interpretación. Proporciona cuatro tipos de puntuaciones normativas de referencia: puntuaciones escalares, compuestas, percentiles y puntuaciones de desarrollo. También se ofrecen intervalos de confianza para las escalas y puntuaciones de edad equivalente para las pruebas. Las puntuaciones escalares se obtienen a partir de las puntuaciones directas de la prueba y oscilan entre 1 y 19, con una media de 10 y una desviación típica de 3. Las puntuaciones compuestas se basan en la suma de las puntuaciones escalares de la prueba. Se escalan métricamente con una media de 100 y una desviación típica de 15 y oscilan entre 46 y 154. Permiten comparar el rendimiento del niño en las tres escalas cognitiva, lenguaje y motora. Los percentiles indican la posición del niño en relación con otros niños de la misma edad. Los percentiles oscilan entre 1 y 99, con una media y mediana de 50. Asimismo, para las escalas se ofrecen intervalos de confianza, que indican el rango de puntuaciones en el que se espera que se sitúe la puntuación real del niño, y constituyen otro medio para expresar la precisión de las puntuaciones del test. Las puntuaciones de edad equivalente representan la edad promedio, en meses, en la que es más frecuente obtener una determinada puntuación directa. Las puntuaciones de desarrollo se utilizan para registrar el rendimiento del niño en cada prueba a lo largo del tiempo. Está ampliamente demostrado que la valoración temprana y seguimiento del desarrollo neuropsicológico es especialmente importante en los pacientes con factores de riesgo, ya que la detección temprana de las alteraciones facilita el inicio de una atención y apoyo a los padres y niños que resulta ser beneficiosa a largo plazo. Además, esta escala puede ayudar a los clínicos a profundizar en la diferenciación entre diferentes niveles de severidad, aportando un mayor rigor en la toma de decisiones asistenciales.

Existen otras escalas más simples, baratas y cortas de administrar, como son *el Cuestionario de Edades y Etapas ASQ-3*, *la Prueba de Tamizaje del desarrollo Denver-II*, *el Inventario de desarrollo Batelle (BDI-2)*, *el Inventario de desarrollo de Habilidades Comunicativas McArthur-Bates* y *el WHO-desarrollo motor*. Estas escalas presentan la ventaja que por su sencillez no se requiere gran entrenamiento, con lo que incluso pudiera obtenerse mucha información al realizarla los padres en domicilio. Pero, todavía se requieren más estudios que evalúen el valor real de estas escalas¹⁵³.

I.8.1. Parálisis cerebral

Una de las secuelas más temidas de la EHI es la parálisis cerebral. Se define por un trastorno permanente en el desarrollo de los movimientos y de la postura. Es una condición heterogénea con múltiples tipos clínicos, patrones en neuroimagen, patologías asociadas y múltiples causas y de forma global, afecta a 2-2,5 por 1000 RN. Según las diferentes series publicadas, en los países desarrollados de los pacientes con EHI un 13-14% presentarán parálisis cerebral y hasta un 20% de los casos de parálisis cerebral en la niñez se deben a EHI, es decir, que existen otras muchas causas relacionadas con dicha enfermedad, siendo la principal la prematuridad^{154,155}. Otros factores clínicos de riesgo para la parálisis cerebral son: diferentes mutaciones genéticas, las infecciones intrauterinas bacterianas o víricas, la fiebre durante la gestación, el retraso de crecimiento intrauterino, la hemorragia anteparto, circular de cordón, la amenaza de aborto o la historia previa de feto muerto, un estado de respuesta inflamatoria anormal en el feto o en el neonato, la gestación múltiple, las edades extremas maternas (<20 o >35 años), la patología placentaria como corioamnionitis, el sexo masculino y la afectación postnatal en forma de meningoencefalitis, kernicterus, hemorragia intracraneal, convulsiones neonatales, sepsis, distrés respiratorio, error congénito del metabolismo y otras alteraciones genéticas¹⁵⁵. En los últimos 50 años, la prevalencia de la parálisis cerebral se mantiene estable, a pesar de los avances en los cuidados obstétricos y neonatales. Solamente se ha demostrado reducir el riesgo en los casos relacionados con EHI gracias al tratamiento con hipotermia (se reduce el riesgo de muerte o discapacidad neurológica mayor en 1 de cada 6 niños tratados¹¹⁵; en el estudio de *Garfinkle et al* estimaron que un 5,1% de los casos de parálisis cerebral debidos a

EHİ se podrían prevenir con el tratamiento con hipotermia¹⁵⁶ y en el estudio de *Jary et al*, objetivaron que con el tratamiento con hipotermia se reducía la incidencia de las formas más graves de parálisis cerebral¹⁵⁴) y en los niños muy prematuros con la administración de sulfato de magnesio a sus madres (se necesitan tratar 63 niños para prevenir 1 caso de parálisis cerebral)¹⁵⁷.

En función de la sintomatología neurológica predominante, se pueden distinguir distintas formas: *espásticas* caracterizadas por un aumento de las contracturas musculares que dan lugar a alteración de la postura y de los movimientos con signos piramidales; formas *discinéticas* caracterizadas por movimientos involuntarios, incontrolados, recurrentes y estereotipados, coexistentes con una tonicidad muscular fluctuante; *atáxicas* caracterizadas por un síndrome cerebeloso con defectos en la coordinación motriz voluntaria y formas *mixtas*. Estos problemas motores se acompañan frecuentemente de problemas sensoriales, perceptivos, cognitivos, de la comunicación y del comportamiento, epilepsia y de problemas músculo-esqueléticos secundarios. Todo ello condiciona la existencia de handicaps más o menos importantes para la inserción social y graves repercusiones familiares, de ahí la importancia del adecuado manejo de los pacientes de riesgo como son los niños afectados de EHİ, tanto en la fase aguda de la enfermedad como en su seguimiento a largo plazo.



II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS





II.1. HIPÓTESIS

La acidosis fetal con un $\text{pH} \leq 7,1$ al nacimiento es un indicador de riesgo de daño perinatal y EHI al ponerse en marcha los mecanismos neurotóxicos mediados por el glutamato.

Los pacientes con acidosis perinatal tienen un riesgo aumentado de resultados adversos a corto y a largo plazo.

El desarrollo de tratamientos que actúen limitando la neurotoxicidad mediada por el glutamato añadirá una posibilidad terapéutica al tratamiento con hipotermia permitiendo mejorar el pronóstico de los pacientes con EHI. La GOT es una enzima limpiadora de glutamato, por lo que su respuesta en la agresión hipóxico-isquémica perinatal puede tener un valor importante.

II.2. OBJETIVOS

Principales:

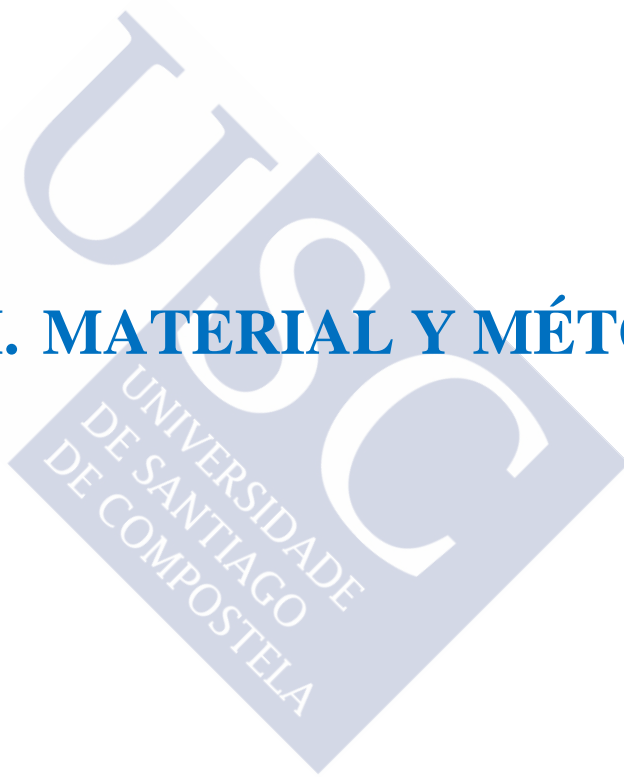
- Valorar los niveles séricos de glutamato en pacientes con acidosis fetal al nacimiento con $\text{pH} \leq 7,1$ (pH de riesgo para resultados neurológicos adversos) (casos) y en pacientes con $\text{pH} > 7,1$ (controles) y determinar si existe una relación entre las concentraciones de glutamato y el pH sanguíneo.
- Valorar las concentraciones séricas de transaminasas (GOT, GPT y GGT) en pacientes con pH de riesgo para resultados adversos y en pacientes con $\text{pH} > 7,1$ y determinar si existe relación entre las cifras de transaminasas, el pH sanguíneo y las concentraciones de glutamato.
- Realizar una evaluación neurocognitiva mediante la escala de Bayley III en todos los pacientes a los 2 años de edad y comparar los resultados obtenidos en ambos grupos.

Secundarios:

- Valorar las concentraciones séricas de CK en pacientes con $\text{pH} \leq 7,1$ y en pacientes con pH superior y determinar si existe relación entre las cifras de CK y el pH sanguíneo y con el tipo de parto.
- Determinar si existen diferencias en las concentraciones de glutamato, transaminasas y CK según el peso y el sexo de los pacientes.
- Determinar la incidencia de EHI en los pacientes con acidosis perinatal con $\text{pH} \leq 7,1$ y su grado de severidad.
- Determinar la incidencia de manifestaciones extraneurológicas en los pacientes con $\text{pH} \leq 7,1$ al nacimiento.
- Realizar un seguimiento clínico de los pacientes durante 2 años a través de los datos recogidos en sus historias clínicas en el sistema informático de nuestro Servicio Gallego de Salud (IANUS) y comparar la evolución de los pacientes en ambos grupos. Comparar los datos antropométricos, especialmente el perímetro de cráneo (PC), entre el grupo de casos frente al de controles a los 2 años de vida.

Nuestro objetivo final es aumentar el conocimiento en la neurotoxicidad mediada por el glutamato y asentar las bases para el desarrollo de nuevas armas terapéuticas que de forma coadyuvante a la hipotermia nos ayuden a mejorar el pronóstico en los pacientes con EHI.

III. MATERIAL Y MÉTODOS





III.1. Diseño del estudio

Se llevó a cabo un estudio prospectivo de casos y controles en neonatos nacidos en el Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela, durante 9 meses, de octubre de 2013 a junio de 2014. Se reclutaron grupos paralelos de pacientes en función de la presencia o ausencia de acidosis con un $\text{pH} \leq 7,1$ (pH umbral para efectos neurológicos adversos) al nacimiento en sangre arterial de cordón. Los pacientes definidos como casos fueron aquellos que presentaron al nacimiento un $\text{pH} \leq 7,1$ y como controles aquellos con un pH superior. Previo al reclutamiento de los pacientes, se solicitó consentimiento informado a sus padres.

Se incluyeron en el estudio 46 recién nacidos, 23 de ellos con un pH sanguíneo $\leq 7,1$ al nacimiento, y 23 con un pH superior.

Se consideró:

- a) $\text{pH} \leq 7,1$ como el pH umbral para efectos neurológicos adversos¹⁵⁸
- b) Agresión hipóxico-isquémica perinatal, si se cumple al menos uno de los siguientes criterios:
 - pH de cordón $\leq 7,0$
 - Test de Apgar a los 5 minutos ≤ 5
 - RCP avanzada con necesidad de intubación y/o masaje cardíaco o prolongada con necesidad de VPPI durante al menos 5 minutos
- c) Asfixia perinatal/ EHI “significativa”, si se cumplen todos los criterios siguientes:
 - Acidosis metabólica profunda con un pH arterial $< 7,0$.
 - Test de Apgar < 4 a los 5 minutos.
 - Evidencia de compromiso neurológico.
 - Compromiso de otros órganos.
- d) La gravedad de la EHI fue definida según las puntuaciones obtenidas en la escala de García-Alix como:
 - No EHI: < 2 puntos
 - EHI leve: 2-6 puntos
 - EHI moderada-grave: ≥ 6 puntos

Se realizó en todos los casos exclusión de otras causas que pudieran justificar el cuadro encefalopático del paciente.

III.2. Pacientes

En todos los pacientes se registraron las siguientes variables: fecha de nacimiento, sexo, peso, longitud, PC, edad gestacional, tipo de parto, puntuación de APGAR al minuto (Apgar1), Apgar5 y diez minutos de vida (Apgar10), frecuencia cardíaca (Fc) y T^a corporal.

A nivel analítico, se registró el pH, la concentración de bicarbonato, el exceso de bases (EB), lactato, glutamato, transaminasas, GOT, GPT y GGT, y CK a partir del análisis de la sangre de cordón al nacimiento.

También se registraron datos anteparto sugestivos de riesgo de hipoxia-isquemia fetal como son la sospecha de pérdida del bienestar fetal por las alteraciones en la frecuencia cardíaca, la presencia de desaceleraciones tardías, líquido meconial y/o un pH patológico en el cuero cabelludo; datos sugestivos de la existencia de un evento hipóxico centinela como la hipotensión y la hipoxia materna, alteraciones en el cordón umbilical, problemas placentarios o uterinos y también la existencia de una distocia de parto (distocia de hombros, fracaso del parto instrumentalizado).

Se evaluaron datos sobre los tratamientos y otros cuidados empleados en los pacientes: necesidad de ingreso en el Servicio de Neonatología y tiempo de estancia, necesidad de reanimación básica o avanzada al nacimiento (intubación, masaje cardíaco, VPPI durante más de 5 minutos, adrenalina, bicarbonato, expansión volumétrica), canalización de vías centrales, estabilidad respiratoria y necesidad de soporte respiratorio, estabilidad hemodinámica y precisión de soporte ionotrópico, diuresis, tipo de alimentación, tiempo para iniciar la alimentación oral y funcionalidad intestinal, evaluación neurológica sistematizada mediante la escala de *García-Alix* y hallazgos en pruebas de imagen mediante ecografía transfontanelar y renal (en todos los pacientes se realizó ecografía transfontanelar y renal en la primera semana de vida y en los pacientes con cuadros de EHI se realizó ecografía transfontanelar en las primeras 24 horas). En

todos los casos se valoró la función renal mediante el control de la diuresis y la medición de la creatinina sérica.

Además, en los pacientes que cumplieron criterios clínicos de EHI, se realizó registro EEGa, y en los que presentaron formas moderadas a severas se realizó además EEG convencional, determinación de biomarcadores de daño neurológico (S100 y ENE en sangre y S100 en orina), determinación de troponina I cardíaca, RM y PET cerebral y valoración de la inclusión en tratamiento con hipotermia activa.

En el seguimiento, se registraron los datos relacionados con el desarrollo neurológico de los pacientes y con padecimientos de enfermedades generales o alteraciones neurológicas. En la revisión presencial de los 2 años, se anotaron todas las puntuaciones que engloba la escala de Bayley III en cada uno de sus dominios (cognitivo, comunicación receptiva y expresiva, motricidad fina y gruesa), así como los datos recogidos en el Inventario de observación conductual completado por el cuidador y por el examinador. Todas las valoraciones fueron realizadas por un mismo evaluador-observador. También se registraron los parámetros somatométricos (peso, longitud y PC).

III.3. Método analítico y clínico

- Para realizar el análisis del glutamato sérico las muestras de suero fueron recogidas en tubos de EDTA y centrifugadas a 3000 rpm durante 7 minutos. El suero fue separado e inmediatamente congelado y guardado a -80°C. Las concentraciones séricas de glutamato fueron determinadas por medio de Glutamate Assay Kit (Abnova, Taipei City, Taiwan), siguiendo las recomendaciones técnicas del fabricante.
- La actividad de la GOT, GPT, GGT y CK fue determinada por medio del Reflotron GOT, GPT, GGT y CK test siguiendo la descripción técnica del fabricante (Roche, Basel, Switzerland). Se consideró GPT normal hasta 60 UI/L en niños y 55 UI/L en niñas, GOT normal hasta 70 UI/L, GGT normal hasta 177 UI/L en niños y 156 UI/L en niñas. La hepatitis hipóxica fue definida por la presencia de hipertransaminasemia

con cifras de transaminasas superiores a 2 veces el límite superior considerado normal. Se consideraron valores normales de CK entre 30-380 UI/L.

- El pH, concentración de bicarbonato, EB y lactato, se determinaron a partir del análisis gasométrico de la sangre de cordón al nacimiento en Siemens Rapidpoint 500 Automatic QC Cartridge.
- En cuanto a la función renal en los casos, se realizó una medición continua de la diuresis mediante el pesado de pañales y en los pacientes con formas de EHI moderada-graves mediante sondaje vesical. La creatinina sérica fue medida con el sistema de química clínica Dimension empleando una técnica de Jaffé cinética modificada y se consideraron normales valores de creatinina <1,2 mg/dL en las primeras 24 horas de vida y <0,5 mg/dL a los 5 días de vida. El daño renal agudo fue definido por la presencia de oligoanuria (diuresis <1ml/kg/h) y/o incremento de al menos 0,3 mg/dL o del 50% en las cifras de creatinina sérica en 2 días consecutivos o creatinina plasmática >1,5 mg/dL a las 48 horas de vida.
- Se consideró compromiso sistémico la afectación de 1 o varios órganos o sistemas fuera del SNC y justificado por hipoxia-isquemia.
- Se consideró compromiso neurológico la afectación del SNC en forma de cuadro encefalopático y justificado por hipoxia-isquemia.
- Para la comparación de los datos somatométricos, se usaron los estándares internacionales de supervisión del crecimiento. Para los datos del nacimiento se emplearon las gráficas de crecimiento Intergrowth-21 (IT-21), que permiten conocer la posición de cada niño según el sexo y la edad gestacional. Para los datos de los 2 años se usaron las gráficas de la OMS que permiten conocer la posición de cada niño según el sexo y la edad en años y con la calculadora antropométrica contenida en el software OMS Anthro se puede hacer un cálculo rápido y de forma automatizado de los percentiles y de las desviaciones estándares. Ver *Anexo 3*.
- La monitorización de la T^a se realizó mediante medición axilar, medición transcutánea o medición central a nivel vesical o rectal.
- La medición de la Fc se realizó con monitorización electrocardiográfica o mediante

pulsioximetría.

- La ecografía fue realizada con el ecógrafo Toshiba Aplio XG modelo SSA-790A. Las determinaciones doppler fueron realizadas en ramas de la arteria carótida interna intracraneal. Con la ecografía transfontanelar se consideró patológico la presencia de hiperecogenicidad difusa compatible con edema cerebral, la hiperecogenicidad a nivel cortical, en la SB, en los tálamos y en los GB y la atrofia cerebral y/o encefalomalacia multiquística. A nivel doppler, se consideraron normales los valores de IR 0.70 ± 0.10 y Vm de 0.12 ± 0.01 m/s en las primeras 24 horas de vida e IR 0.64 y Vm 0.22 m/s en los días siguientes y patológicos los patrones de hiperemia con aumento de la Vm y disminución del IP y del IR (<0.55) y de isquemia con disminución de la Vm y aumento del IP y del IR.
- En los pacientes con EHI, el registro continuo de la actividad eléctrica cerebral mediante EEGa se realizó con el monitor de función cerebral Olympic CFM 6000. Se consideraron patológicos el patrón discontinuo, el continuo de bajo voltaje, el brote-supresión, el trazado plano o inactivo, la presencia de actividad paroxística y la ausencia de ciclos de sueño-vigilia.
- En los pacientes con EHI moderada-grave, la proteína S100 y la ENE fueron medidas mediante inmunoanálisis electroquimioluminiscente. Los resultados se obtuvieron utilizando una curva de calibración generada por el sistema a partir de una calibración de 2 puntos y una curva maestra incluida en el código de barras del reactivo. Las cifras de ENE sérica superiores a $40 \mu\text{g/L}$, de S100B en sangre mayores de $2 \mu\text{g/L}$ y en orina superiores a $1 \mu\text{g/L}$ fueron consideradas patológicas. La troponina I cardiaca se midió con el sistema integrado de química Dimension EXL con el módulo LOCI que emplea como método el inmunoensayo de quimioluminiscencia tipo sándwich homogéneo basado en la tecnología LOCI. Se consideraron concentraciones normales hasta $0,15 \mu\text{g/L}$. El EEG fue hecho con el software Neuro-DMS (Nihon Kohden). Se consideró normal el EEG con actividad continua, sin períodos de supresión y patológico la existencia de cualquiera de los siguientes patrones de alteración eléctrica: asimetrías interhemisféricas, enlentecimiento generalizado, períodos de supresión que intercalados con actividades de tipo paroxístico dan lugar a un trazado de tipo brote-supresión, inactivo o patrones

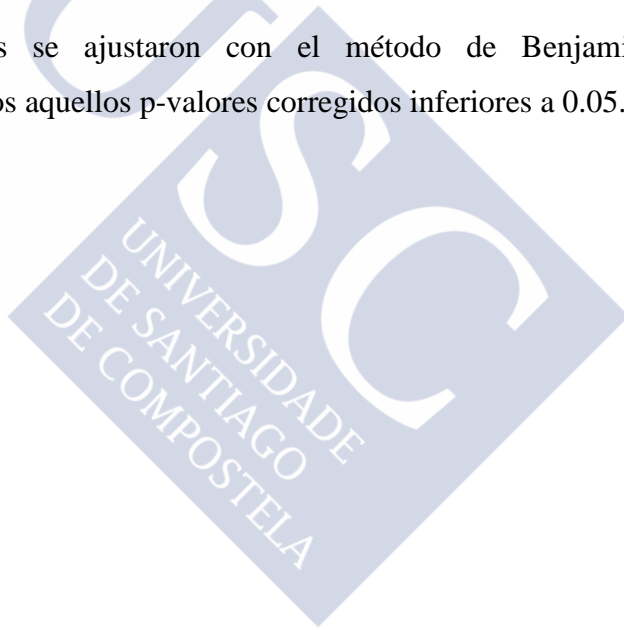
menos comunes como el ritmo alfa, beta, Theta y el patrón de ondas trifásico. La RM cerebral fue realizada usando el 1.5-tesla MRI scanner (Siemens Sonata). La pérdida de la diferenciación entre la corteza y la sustancia blanca, el aumento de la intensidad de señal en el área cortical perirrolándica, la desaparición de la hiperseñal fisiológica del BPCI, la hiperseñal del tálamo y los GB y en las zonas de unión fronterizas de los territorios vasculares, la hiperseñal de la sustancia blanca, del tronco cerebral y cortical, así como la restricción de la difusión en dichos territorios fueron hallazgos considerados patológicos. La PET cerebral fue analizado con el sistema GE Advance NXi y se consideró anormal la presencia de hipometabolismo focal o multifocal. Para la realización de hipotermia terapéutica se empleó el método de enfriamiento corporal total mediante el equipo TecothermTS med 200 N que regula la T^a corporal a través de las mediciones de una sonda colocada a nivel rectal. Se mantuvo el enfriamiento entre 33,5 y 34,5°C durante 72 horas y se recalentó lentamente ($\leq 0,5$ °C por hora).

- En la valoración del neurodesarrollo a los 2 años se empleó la Escala Bayley de desarrollo infantil-III (Bayley III). La escala se realizó en una sala tranquila, bien iluminada y ventilada, y libre de distracciones. Todos los niños fueron evaluados en presencia de sus madres y/o padres, en las horas de la tarde en que los familiares referían que solían estar activos, asegurándose con ello la alerta y cooperación de los niños. Las puntuaciones obtenidas en cada uno de los 3 dominios analizados por la escala fueron categorizadas por la severidad de la anormalidad basada en la media poblacional 100 ± 15 . De forma que, se consideró retraso grave cuando las puntuaciones se localizaron >2 desviaciones estándar por debajo de la media poblacional (puntuaciones <70), retraso moderado entre >1 y ≤ 2 desviaciones estándar por debajo de la media poblacional (puntuaciones de 70-84) y normal con puntuaciones ≤ 1 desviación estándar por debajo de la media poblacional (puntuaciones >84).

III.4. Análisis estadístico

Los resultados fueron analizados con el software estadístico R (version 3.3.1, 2016). Cuando las variables a comparar eran una cualitativa y la otra cuantitativa, se usó el test de Shapiro-Wilks para determinar la normalidad de la variable cualitativa. En los casos en los que se seguía una normal, se usó el test t de Student si la variable cuantitativa tenía dos niveles, y un ANOVA si tenía más de dos. En los casos en los que no se seguía una normal, se usó el test de los rangos de Wilcoxon si la variable cuantitativa tenía dos niveles, y el test de Kruskal-Wallis si tenía más de dos. Si las dos variables eran cualitativas, y ambas seguían una normal, se utilizó el test de correlación de Pearson; en caso contrario, se utilizó el test de correlación de Spearman. Si las dos variables eran cuantitativas, se utilizó el test exacto de Fisher.

Los p-valores obtenidos se ajustaron con el método de Benjamini-Hochberg, considerando significativos aquellos p-valores corregidos inferiores a 0.05.





IV. RESULTADOS





IV.1. Características de los grupos de estudio

IV.1.1. Casos

En el grupo de los casos, todos ellos con un pH al nacimiento $\leq 7,1$, se incluyeron 13 varones (V) (56,52%) y 10 mujeres (M) (43,48%), la mayoría (21 casos, 91,3%) RN a término (≥ 37 semanas de edad gestacional), con una edad gestacional media de 39+5 semanas.

El peso medio al nacimiento fue de 3170,87 gramos (rango 1410-4640 gramos). Empleando las gráficas de crecimiento IT-21 solamente 1 caso (N6) fue de peso elevado para la edad gestacional (GEG), definido por un peso al nacimiento superior al percentil (p) 90 ($>p90$) para la edad gestacional y 1 (N13) fue pequeño para la edad gestacional (PEG), definido por un peso al nacimiento $<p10$ para la edad gestacional. La longitud media al nacimiento fue de 49,08 cm (entre 41 y 54 cm). El PC medio fue de 34,31 cm (rango 27 y 38,5 cm). 2 casos (N8 y N13) tenían microcefalia, definida por un PC $<p10$ para la edad gestacional (*Tabla 11*).

Casos	Sexo	Peso (g)/ p	Longitud (cm)/ p	PC (cm)/ p	Edad Gestacional (s)
N1	V	3420/ p40	50/ p40	35,5/ p70	41 + 2
N2	M	1410/ p70	41/ p80	27/ p50	30 + 2
N3	V	3690/ p70	53/ p90-97	36,5/ p90-97	41 + 1
N4	V	3760/ p70	50,5/ p50	35/ p60	41
N5	V	2620/ p40	48/ p60	33,2/ p60	36 + 4
N6	V	4640/ >p97	54/ >p97	36/ p70	40
N7	M	2900/ p30	48/ p30	34,5/ p80	39 + 4
N8	V	3680/ p70	54/ >p97	32/ <p3	40 + 2
N9	M	2880/ p20	49/ p70	33,5/ p70	38 + 1
N10	M	3150/ p30	48/ p10	37/ >p97	41 + 3
N11	V	3120/ p30	49/ p30	34/ p40	39 + 6
N12	M	3460/ p70	49/ p60	33/ p40	39 + 1
N13	V	2600/ p3-10	46,3/ p3-10	32/ p3-10	39
N14	V	3350/ p40	50/ p40	35/ 70	41
N15	M	3230/ p70	49/ p70	36/ >p97	38 + 2
N16	M	2850/ p30	45,7/ p3-10	33,5/ p60	39 + 4
N17	V	2680/ p20	45/ <p3	34/ p60	38+5
N18	M	3320/ p60	49/ p40	33,5/ p40	40+3
N19	V	3440/ p50	50/ p50	36/ p90	40+2
N20	M	3040/ p20	50/ p50	33/ p10	41+4
N21	V	3430/ p60	49/ p30	38,5/ >p97	39+5
N22	M	2980/ p20	50,8/ p70	34,5/ p60	41
N23	V	3280/ p30	50,5/ p50	36/ p80	40+5

Tabla 11: Características del grupo de casos: Sexo, datos somatométricos y edad gestacional.

(M: Mujeres; V: Varones; p: Percentil; PC: Perímetro de cráneo; s: Semanas)

Al minuto de vida, 5 casos (21,7%) tuvieron una puntuación de Apgar ≥ 9 puntos y 7 (30,4%) ≤ 5 , pero a los 5 minutos solamente en 3 (13,04%) persistía esa puntuación, siendo todos ellos V. Dos casos (8,7%) tuvieron un Apgar5 < 4 . La puntuación media Apgar1 fue de 6,17 y Apgar5 fue de 7,83 puntos.

Según la vía de parto, 5 casos (21,7%) nacieron por parto vaginal eutócico de vértice (PEV), 11 (47,8%) por parto instrumentalizado (PI) (ventosa/ fórceps) y 7 (30,4%) por cesárea (Cx) con indicación urgente (Cx Ux) 6 de ellos.

En cuanto a los indicadores de riesgo de hipoxia-isquemia fetal, 17 casos (73,9%) mostraron algún dato de riesgo (*Tabla 12*).

Casos	Apgar (1/5)	Fc (lpm)	Tª (°C)	Tipo de Parto	Indicador de Riesgo de Hipoxia-Isquemia Perinatal
N1	2/5	100	36,7	Ventosa	Líquido meconial
N2	6/9	135	35,5	Cx Ux	SPBF
N3	8/9	140	37,1	Ventosa	Líquido meconial
N4	8/9	120	36,5	Cx Ux	SPBF. pH calota 7. Desaceleraciones tardías
N5	6/9	120	36,9	Ventosa	-
N6	7/8	150	37	PEV	Líquido meconial
N7	9/10	144	36	Cx por podálica	-
N8	0/0	160	33,7	Cx Ux	SPBF, bradicardia sostenida, líquido meconial
N9	4/7	110	37	Ventosa	-
N10	9/10	160	36	PEV	Líquido meconial
N11	8/8	135	36	Ventosa	-
N12	5/6	164	35,6	Ventosa	Desaceleraciones tardías
N13	2/6	140	36,9	Cx Ux	SPBF
N14	9/10	110	36,5	Cx Ux	SPBF
N15	6/9	180	37	Cx Ux	Sangrado vaginal materno
N16	9/10	132	37,1	PEV	Circular de cordón, bradicardia en expulsivo
N17	9/10	180	36,4	PEV	-
N18	8/10	130	37	Ventosa	-
N19	8/10	130	36	Ventosa	Líquido meconial
N20	6/7	154	37	Ventosa	Bradicardia en expulsivo
N21	2/3	130	37	Ventosa+fórceps	Distocia de parto (deflexión cabeza fetal)
N22	6/8	140	37,5	Ventosa	Taquicardia fetal
N23	5/7	130	36,2	PEV	Líquido meconial

Tabla 12: Características del grupo de casos: Apgar, Fc, Tª, tipo de parto, indicador de riesgo de hipoxia-isquemia perinatal.

(Apgar1: Apgar al minuto de vida; Apgar5: Apgar a los 5 minutos de vida; Fc: Frecuencia cardiaca; lpm: Latidos por minuto; Tª: Temperatura; Cx: Cesárea; Cx Ux: Cesárea urgente; PEV: Parto eutócico de vértice; SPBF: Sospecha de pérdida del bienestar fetal)

Precisaron RCP avanzada (reanimación profunda=RP) con intubación y/o masaje cardiaco o VPPI durante más de 5 minutos 8 casos (34,8%). Necesitaron reanimación

superficial (RS) con VPPI durante menos de 5 minutos 6 casos (26,1%) y no requirieron ningún tipo de reanimación al nacimiento 9 casos (39,1%).

El valor medio de pH fue 6,97 (entre 6,6 y 7,1). El valor medio de bicarbonato fue de 17,89 mmol/L (entre 9,3 y 25,9 mmol/L). El exceso de bases medio fue de -14,07 mmol/L (entre -4,9 y -27 mmol/L). La concentración media de lactato al nacimiento fue de 9,61 mmol/L (entre 4,5 y 15,9 mmol/L). Un total de 18 casos (78,3%) tuvieron una hiperlactacidemia >7,5 mmol/L. La concentración media de láctico a la hora de vida fue de 9,51 mmol/L y a las 24 horas de 2,31 mmol/L (*Tablas 13 y 14*).

Casos	RCP	pH	Bicarbonato (mmol/L)	EB (mmol/L)	Lactato (mmol/L)
N1	VPPI >5', masaje 30 s	6,92	11,7	-17,5	12,3
N2	VPPI >5'	7,06	19,4	-12,4	7,4
N3	Intubación, VPPI >5'	7,07	19,5	-11,6	11,2
N4	-	7,07	18,1	-14,1	8,1
N5	VPPI <5'	6,9	21,3	-13,7	5,6
N6	-	7,04	15,3	-10,6	6,7
N7	-	7,01	20,9	-12,2	8,2
N8	Intubación, VPPI, masaje, adrenalina ET e IV, Bicarbonato, SSF	6,6	14	-27	12,5
N9	VPPI <5'	7,1	17,3	-11,5	7,95
N10	-	7,1	25,9	-4,9	4,5
N11	-	7,07	22,5	-9,7	9,4
N12	VPPI <5'	6,85	17,4	-18,7	11,1
N13	VPPI >5'	6,67	10,6	-25,9	15,9
N14	-	6,96	18	-16	10,7
N15	VPPI <5'	7,02	20,5	-10	5,3
N16	-	7,04	22,8	-10,1	8,3
N17	-	7,06	22,2	-9,9	8,5
N18	VPPI <5'	7,06	20,4	-11	9,1
N19	-	7,07	17,9	-12,9	9,6
N20	Intubación, VPPI >5'	7,08	13	-15	10
N21	VPPI >5'	6,89	9,3	-24	14,2
N22	VPPI <5'	7,07	16,4	-10,8	10,1
N23	Intubación, VPPI >5'	6,7	17	-13	14,3

Tabla 13: Características del grupo de casos: Necesidad de RCP, equilibrio ácido-base y láctico. (RCP: Reanimación cardiopulmonar; VPPI: Ventilación con presión positiva intermitente; ET: Endotraqueal; IV: Intravenoso; SSF: Suero salino fisiológico; EB: Exceso de bases)

En 9 casos (39,1%) los niveles de láctico aumentaron en la primera hora de vida, en el resto disminuyeron o se mantuvieron igual (en 4 casos no se obtuvo muestra). A las 24 horas, todos tenían niveles de láctico $<3,6$ mmol/L (*Tabla 14*).

Casos	Lactato al nacimiento (mmol/L)	Lactato 1 hora (mmol/L)	Lactato 24 horas (mmol/L)
N1	12,3	13	1,4
N2	7,4	11,9	2,5
N3	11,2	11,3	3,1
N4	8,1	7,3	2,3
N5	5,6	3,9	2,8
N6	6,7	1,2	1,5
N7	8,2	3,1	1,6
N8	12,5	28	Éxito 5 horas
N9	7,95	10,5	2,3
N10	4,5	-	-
N11	9,4	-	1,7
N12	11,1	12,7	3,3
N13	15,9	17	2,9
N14	10,7	5	3
N15	5,3	5,4	1,4
N16	8,3	8,3	1,9
N17	8,5	-	-
N18	9,1	5	3,6
N19	9,6	7,2	2
N20	10	10,5	3
N21	14,2	-	1,9
N22	10,1	8,7	2
N23	14,3	5,9	1,9

Tabla 14: Características del grupo de casos: Evolución de las concentraciones de láctico al nacimiento, a la hora y a las 24 horas de vida.

(-: No determinado)

Las concentraciones medias de glutamato en la primera hora de vida fueron de 151,32 μ mol/L (rango: 45,3 y 420,2 μ mol/L), las de GOT de 83,34 UI/L (rango: 27 y 217 UI/L), de GPT de 24,29 UI/L (rango: 5,77 y 85,3 UI/L) y las de GGT de 160,29 UI/L (rango: 61,5 y 359 UI/L). Las concentraciones medias de CK fueron de 145,83 UI/L (rango: 24 y 457 UI/L) (*Tabla 15*).

Casos	Glutamato ($\mu\text{mol/L}$)	GOT (UI/L)	GPT (UI/L)	GGT (UI/L)	CK (UI/L)
N1	69,8	200	75,6	110	181
N2	45,3	33,7	15,2	198	-
N3	85,1	59,3	7,08	97,4	66,4
N4	49,2	-	6,3	99,3	257
N5	209,9	35,6	-	-	24
N6	86,6	128	10,2	71,2	24
N7	398,6	47	<5	235	77,9
N8	153,6	110	12,9	102	396
N9	206,5	85,6	9,69	187	55,9
N10	420,2	101	-	-	-
N11	82,7	48,9	14,6	150	24
N12	155,9	73,4	85,3	73,6	190
N13	86,5	31,6	11,7	171	234
N14	206,7	49,1	<5	182	-
N15	221,7	217	35,8	257	111
N16	103,6	27	12,7	173	97
N17	115,9	33,5	<5	245	158
N18	216,4	46	5,77	81,1	155
N19	187,7	67,1	11,8	359	92,8
N20	111,3	54,1	<5	114	24
N21	107,7	215	66,8	288	-
N22	66,3	46,5	7,19	61,5	457
N23	93,2	124	<5	111	-

Tabla 15. Características del grupo de casos: Concentraciones de glutamato, transaminasas y CK en la primera hora de vida.

(GOT: Transaminasa glutámico-oxaloacética; GPT: Transaminasa glutámico-pirúvica; GGT: Gamma glutamil transpeptidasa; CK: Creatina kinasa; -: No determinado)

Desde un punto de vista clínico, en 5 casos (21,7%) se objetivó alguna forma de compromiso neurológico agudo (N1, N8, N12, N13 y N21) y en 6 (26,1%) de compromiso sistémico (N5, N8, N13, N16, N21 y N22), siendo el riñón el órgano más frecuentemente afectado (Tabla 16).

Casos	Compromiso Neurológico	Compromiso Sistémico
N1	García- Alix: 5/ 3/ 2 puntos a la 1/ 3/ 5 horas de vida (EHI leve)	-
N2	-	-
N3	-	-
N4	-	-
N5	-	Afectación renal (oliguria, hematuria, IRA)
N6	-	-
N7	-	-
N8	García-Alix: 50 puntos a la 1 hora de vida, EEG escaso voltaje (EHI moderada-grave)	Fallo multiorgánico
N9	-	-
N10	-	-
N11	-	-
N12	García-Alix: 2/1/0 puntos a la 1/3/5 horas de vida (EHI leve)	-
N13	García-Alix: 5/ 3/ 2 puntos a la 1/ 3/ 5 horas de vida (EHI leve)	Afectación renal (IRA)
N14	-	-
N15	-	-
N16	-	Afectación digestiva (enterocolitis necrosante)
N17	-	-
N18	-	-
N19	-	-
N20	-	-
N21	García-Alix: 10 puntos a la 1 hora de vida. Hipotermia activa. Paresia braquial y Síndrome Horner parcial izquierdo. (EHI moderada-grave)	Afectación hepática (coagulopatía, hipertransaminasemia). Afectación cardíaca (troponina I elevada)
N22	-	Afectación renal (oliguria)
N23	-	-

Tabla 16. Características del grupo de casos: Manifestaciones clínicas neurológicas y extraneurológicas en las primeras 48 horas de vida.

(EHI: Encefalopatía hipóxico-isquémica; IRA: Insuficiencia renal aguda)

IV.1.2. Controles

En el grupo de los controles (pH al nacimiento $>7,1$), se incluyeron 18 M (78,26%) y 5 V (21,74%), todos ellos RN a término (≥ 37 semanas de edad gestacional), con una edad gestacional media de 39+6 semanas.

El peso medio al nacimiento fue de 3278,69 gramos (rango: 2000-4450 gramos). Un control (N29) fue GEG y otro (N31) fue PEG. La longitud media al nacimiento fue de 49,07 cm (entre 42,5 y 53,2 cm). El PC medio fue de 34,33 cm (entre 30 y 37,5 cm). Un control (N31) fue microcéfalo (*Tabla 17*)

Controles	Sexo	Peso (g)/ p	Longitud (cm)/ p	PC (cm)/ p	Edad Gestacional (s)
N24	M	3400/ p50	49/ p70	33,5/ p60	39 + 3
N25	M	3540/ p60	52/ p95	35,5/ p80	40 + 3
N26	M	2910/p23	46,5/ p3-10	33,5/ p40	40
N27	M	2900/ p40	47,5/ p30	33/ p35	39
N28	M	3360/ p60	49/ p40	33/ p20	40 + 1
N29	M	4450/ >p90	51/ >p90	34/ p65	39
N30	M	3200/ p65	48/ p35	34/ p60	39
N31	M	2000/ p3	42,5/ <p3	30/<p3	37
N32	M	3190/ p50	48,5/ p60	34,5/ p70	39 + 2
N33	V	3340/ p40	49/ p25	35,5/ p70	40 + 6
N34	M	3220/ p50	49/ p45	35,5/ p90-97	40 + 2
N35	V	3510/ p40	52/ p70	34,5/ p30	41 + 6
N36	M	3620/ p70	53,2/ >p97	37,5/ >p97	41
N37	V	3760/ p80	53/ >p97	36/ >p90	39 + 2
N38	M	3180/ p65	47,5/ p40	33,5/ p65	38 + 2
N39	V	3500/ p80	51/ p90-97	35,5/ p90-97	38+2
N40	M	3120/ p60	47/ p30	35,5/ p90-97	38 + 4
N41	M	3400/ p40	49,5/ p40	34/ p40	41 + 3
N42	V	3370/ p60	48,5/ p30	34,5/ p65	39
N43	M	3090/ p40	47/ p20	33/ p40	39 + 3
N44	M	3010/ p30	49/ p40	34/ p50	40+4
N45	M	2870/ p40	48/ p50	34/ p70	38+3
N46	M	3470/ p60	51/ p70	35,5/ p90	41+4

Tabla 17: Características del grupo de controles: Sexo, datos somatométricos y edad gestacional
(M: Mujer. V: Varón. p: Percentil. PC: Perímetro de cráneo. s: Semanas)

Todos los controles tuvieron un Apgar1 y Apgar5 ≥ 5 . La puntuación media al minuto de vida fue de 8,87 y a los cinco minutos de vida fue de 9,87 puntos.

Según la vía de parto, 10 controles (43,5%) nacieron por PEV, 1 (4,3%) por PI y 12 (52,2%) por Cx. Todas las cesáreas fueron programadas por causas maternas o fetales, excepto una que fue indicada por parto detenido.

En cuanto a los indicadores de riesgo de hipoxia-isquemia fetal, 4 controles (17,4%) mostraron algún dato de riesgo en forma de líquido meconial (*Tabla 18*).

Controles	Apgar (1/5)	FC (lpm)	T ^a (°C)	Tipo de Parto	Indicador de Riesgo de Hipoxia-Isquemia Perinatal
N24	9 10	130	35,8	PEV	-
N25	8 10	130	36,5	PEV	Líquido meconial
N26	9 10	120	37,3	PEV	Líquido meconial
N27	9 10	140	36,6	Cx por estenosis pélvica	-
N28	9 10	130	36,3	PEV	-
N29	9 10	162	36,8	PEV	-
N30	9 10	145	36,3	Cx por miomectomía múltiple	-
N31	9 10	160	36	Cx por vasa previa	-
N32	9 10	144	36,7	Cx por podálica	-
N33	9 10	140	36,5	PEV	-
N34	9 10	140	36,6	Cx por podálica	-
N35	9 10	130	36,5	PEV	-
N36	8 9	156	37,5	PEV	Líquido meconial
N37	9 10	108	36,6	Cx por liquen escleroatrófico materno	-
N38	9 10	120	37	Cx por aneurisma cerebral materno	-
N39	9 10			Cx por laparocèle materno	-
N40	9 10	160	36	Cx por podálica	-
N41	9 10	135	36,6	Cx por parto detenido	-
N42	9 10	150	36,6	Cx por cx previas	-
N43	8 8	130	36	PEV	-
N44	9 10	152	35,8	PEV	Líquido meconial
N45	9 10	180	36,4	Cx por podálica	-
N46	9 10	150	35,6	Ventosa	-

Tabla 18: Características del grupo de controles: Apgar, Fc, T^a, tipo de parto, indicador de riesgo de hipoxia-isquemia perinatal.

(Apgar1: Apgar al minuto de vida. Apgar5: Apgar a los 5 minutos de vida. Fc: Frecuencia cardiaca. lpm: Latidos por minuto. T^a: Temperatura. Cx: Cesárea. PEV: Parto eutócico de vértice)

Solamente un control (4,38%) precisó RP con intubación y VPPI menos 5 minutos en el contexto de líquido meconial. No precisó RCP el 95,6% de los controles.

El valor medio de pH fue 7,27 (rango: 7,11 y 7,38). El nivel medio de bicarbonato fue de 23,68 mmol/L (entre 17,8 y 27,2 mmol/L) y el EB de -3,89 mmol/L (entre -0,2 y -10,5 mmol/L). La concentración media de láctico fue de 4,02 mmol/L (entre 1,8 y 7,11 mmol/L). Ningún control tuvo una hiperlactacidemia > 7,5 mmol/L (*Tabla 19*).

Controles	RCP	pH	Bicarbonato (mmol/L)	EB (mmol/L)	Lactato (mmol/L)
N24	-	7,29	22,8	-3,7	7,11
N25	Intubación, líquido meconial, VPPI, extubación	7,33	17,8	-7	6,83
N26	-	7,33	24,8	-1,4	5,23
N27	-	7,28	25,7	-2	1,8
N28	-	7,32	25	-1,8	2,81
N29	-	7,26	22,8	-4,9	3,55
N30	-	7,11	22	-8,9	5,54
N31	-	7,3	25,5	-1,7	2,2
N32	-	7,24	26,3	-2,1	3,62
N33	-	7,27	26,1	-1,8	4,5
N34	-	7,21	25,2	-4,3	3,41
N35	-	7,31	25,6	-1,5	2,66
N36	-	7,27	20,4	-6,3	4,6
N37	-	7,29	25,1	-2,1	2,15
N38	-	7,3	27,2	-0,2	2,15
N39	-	7,33	25,6	-1,1	2
N40	-	7,21	23,6	-5,2	3,99
N41	-	7,22	22,4	-6,1	5,99
N42	-	7,2	22,1	-6,6	4,46
N43	-	7,13	19,4	-10,5	6,81
N44	-	7,26	23,1	-4,7	4,8
N45	-	7,38	25	-0,3	1,89
N46	-	7,29	21,2	-5,3	4,4

Tabla 19: Características del grupo de controles: Necesidad de RCP equilibrio ácido-base y láctico.

(RCP: Reanimación cardiopulmonar; VPPI: Ventilación con presión positiva intermitente; EB: Exceso de bases)

Las concentraciones medias de glutamato fueron de 63,62 $\mu\text{mol/L}$ (rango: 29,9 - 142,2 $\mu\text{mol/L}$), las de GOT 34,77 UI/L (rango: 14,8 - 86,2 UI/L), las de GPT de 10,37 UI/L (rango: 5,6 - 26,8 UI/L) y las de GGT de 185,59 UI/L (rango: 51,3 - 634 UI/L). Las concentraciones medias de CK fueron de 107,74 UI/L (entre 24 - 268 UI/L) (Tabla 20).

Controles	Glutamato ($\mu\text{mol/L}$)	GOT (UI/L)	GPT (UI/L)	GGT (UI/L)	CK (UI/L)
N24	74,8	44,8	6,5	89,3	24
N25	86,2	50,6	6,1	111	72,5
N26	47,2	39,6	7,2	61,5	24
N27	29,9	23,2	-	-	206
N28	62,9	86,2	12,1	138	230
N29	46,7	28,6	14,7	143	268
N30	51,8	24,7	11,7	171	112
N31	33,6	17,8	7,21	135	160
N32	142,2	54	6,3	303	94,8
N33	69,4	14,8	9,72	634	112
N34	41,5	17,8	9,91	389	122
N35	54,2	73,5	21,3	105	86,7
N36	35,5	29,4	9,91	202	64,7
N37	78,2	26,6	<5	70	178
N38	52,6	31	5,6	251	84,2
N39	54,4	20	17,2	215	48,3
N40	82,9	27,3	26,8	51,3	118
N41	61	24,2	<5	311	120
N42	46,7	22,4	5,64	103	138
N43	66,2	31,2	7,06	57,2	58,3
N44	59,8	34,5	<5	124	65,9
N45	104	47	6,26	94,6	52,9
N46	81,6	30,5	5,8	324	37,7

Tabla 20: Características del grupo de controles: Concentraciones de glutamato, transaminasas y CK en la primera hora de vida

(GOT: Transaminasa glutámico-oxaloacética; GPT: Transaminasa glutámico-pirúvica; GGT: Gamma glutamil transpeptidasa; CK: Creatina kinasa; -: No determinado)

Desde un punto de vista clínico, ningún control presentó compromiso neurológico ni sistémico.

IV.2. Actuación sobre los grupos de estudio

IV.2.1. Actuación sobre el grupo de casos

El manejo de los pacientes en situación de agresión perinatal se inicia inmediatamente tras el nacimiento, valorando al recién nacido y la necesidad de RCP. Como se ha descrito anteriormente, en nuestra serie de casos, precisaron RP 8 niños (34,8%), de los cuales 4 (17,4%) requirieron intubación endotraqueal, 2 (8,7%) masaje cardíaco y 1 de ellos (4,3%), medicaciones urgentes tipo adrenalina ET e IV, bicarbonato y SSF. Necesitaron RS 6 niños (26,1%) y no requirieron ningún tipo de reanimación al nacimiento 9 (39,1%). Tras la estabilización inicial, los pacientes fueron trasladados al Servicio de Neonatología de nuestro hospital.

Cinco de los 23 casos (21,7%) no precisaron ingreso en dicho servicio, manteniéndose clínicamente estables y con buena evolución posterior junto a sus madres en la planta de hospitalización de la Maternidad (N7, N10, N14, N17 y N19) con un tiempo medio de estancia hospitalaria de 2,4 días. Todos ellos tuvieron un Apgar1 ≥ 8 y un Apgar5 de 10, un pH al nacimiento entre 6,96 y 7,1 y ninguno precisó RCP. En todos se constató una introducción de la alimentación oral de forma precoz sin incidencias.

Los controles analíticos seriados para valorar el equilibrio ácido-base, los electrolitos, el lactato y la glucemia mostraron que un único caso (N11) presentó hipoglucemia al nacimiento que se normalizó tras la administración de un bolo de suero glucosado, manteniendo posteriormente cifras de glucemia normales. Por acidosis metabólica persistente 6 casos (26,1%) recibieron bicarbonato sódico IV.

En cuanto a la estabilidad respiratoria, 15 (65,2%) de los casos no precisaron soporte respiratorio, 6 (26,1%) precisaron ventilación mecánica no invasiva y 2 (8,7%) ventilación mecánica invasiva y óxido nítrico inhalado.

Desde el punto de vista de la afectación cardiovascular, 3 casos (13%) recibieron tratamiento inotrópico (N6, N8 y N21), 2 de ellos (N8 y N21) afectados de EHI moderada-grave y en el contexto de isquemia miocárdica con concentraciones de Troponina cardíaca I de 5,094 $\mu\text{g/L}$ y 0,243 $\mu\text{g/L}$ respectivamente, lo que supone una incidencia de patología cardíaca isquémica del 8,7% en acidosis y del 40% en EHI, y 1 (N6) por

afectación cardíaca secundaria a hipertensión pulmonar en el contexto de síndrome de aspiración meconial.

En cuanto a la función renal, en 4 casos (N5, N8, N13, N22), se constató datos compatibles con IRA, 2 de ellos (N8 y N13) presentaban a su vez datos de EHI y en los otros 2 (N5 y N22) no existían datos de EHI, lo que supone una incidencia del 17,4% de IRA en el grupo de casos y del 40% en EHI.

En cuanto a la función hepática, el caso N21 afecto de EHI moderada-grave presentó coagulopatía e hipertransaminasemia por hepatitis hipóxica, lo que significa un 4,3% de afectación hepática hipóxica en acidosis y un 20% en EHI.

La introducción de la alimentación por vía enteral se realizó de forma progresiva en todos los casos. 16 de ellos (69,6%) inicialmente recibieron alimentación parenteral exclusiva con un tiempo medio para el inicio de la alimentación oral de 3,7 días. El caso N16 no afecto de EHI tuvo una enterocolitis necrosante, lo que significa un 4,3% de afectación intestinal por hipoxia-isquemia en acidosis y el N8 presentó un fallo multiorgánico.

En conclusión, 6 casos (N8, N5, N13, N16, N21 y N22) (26,1% de afectación sistémica en acidosis) presentaron alguna forma de compromiso sistémico, siendo el riñón el órgano más frecuentemente afectado.

Concretamente desde un punto de vista neurológico, cumplieron criterios de agresión hipóxico-isquémica (pH de cordón $\leq 7,0$ ó Apgar 5 ≤ 5 ó RP) 11 casos (47,8%; N1, N2, N3, N5, N8, N12, N13, N14, N20, N21, N23), de los cuales, empleando la escala de García-Alix, 5 (21,7%) presentaron EHI, en 3 (N1, N12, N13) la EHI fue leve y en 2 (8,7%) (N8, N21) moderada-grave (cumplieron criterios de asfixia perinatal/ EHI “significativa”).

A nivel ecográfico, los casos N1, N12 y N13, afectados de formas leves de EHI, no presentaron alteraciones ecográficas y los casos N8 y N21 con formas de EHI moderada-severa presentaron hiperecogenicidad generalizada (edema cerebral) y patrón de isquemia a nivel doppler. En los casos sin EHI la ecografía transfontanelar fue normal, salvo en el caso N12 que presentó una colección subgaleal en relación con parto

traumático instrumentalizado con ventosa. La RM cerebral realizada en el caso N21 a la semana de vida mostró hiperseñal y restricción de la difusión en la SB frontal y occipital bilateralmente y a nivel de los hemisferios cerebelosos.

A nivel electroencefalográfico, de los casos con EHI, los N12 y N13, ambos con formas leves de EHI, tuvieron patrones normales en EEGa (patrón continuo). El caso N1 con EHI leve presentó un trazado continuo hipovoltado en las primeras 12 horas de vida con normalización posterior y el caso N21, afecto de EHI moderada-grave, un trazado continuo hipovoltado, sin evidencia de crisis clínicas ni bioeléctricas y con normalización a patrón continuo de voltaje normal a partir de las 72 horas de vida, aunque con la aparición de los ciclos de sueño-vigilia precozmente en las primeras 24 horas. Se le realizaron controles de EEG a las 72 horas y a los 8 y 15 días de vida que fueron normales. Dada la gravedad del caso N8 se le realizó de forma inmediata EEG que mostró un trazado mal organizado y de muy bajo voltaje.

Dentro de los biomarcadores de daño neurológico, el caso N8 tuvo una ENE en sangre de 190,6 µg/L y S100 en sangre 52,5 µg/L en las primeras horas de vida. El caso N21, en las primeras horas de vida y antes de la inclusión en tratamiento con hipotermia, tuvo unas cifras basales de ENE de 86,5 µg/L y S100 1,3 µg/L en sangre y S100 en orina de 11,68 µg/L, objetivándose un descenso progresivo en las cifras de dichos biomarcadores tanto en sangre como en orina con cifras de 53,0 µg/L de ENE y 0,34 µg/L de S100 en sangre y 0,46 µg/L en orina a las 72 horas de vida.

El caso N8 falleció a las 5 horas de vida por fallo multiorgánico, tras acordar con la familia la limitación del esfuerzo terapéutico, lo que supone un 4,3% (1/23) de mortalidad en acidosis y un 20% (1/5) en EHI, y el caso N21 fue incluido en tratamiento con hipotermia activa con enfriamiento corporal total siguiendo el protocolo vigente en nuestra Unidad Neonatal, que se inició a las 3 horas de vida y se mantuvo durante 72 horas. Este paciente sometido a hipotermia activa recibió tratamiento sedoanalgésico con fentanilo.

Evolutivamente, en todos los casos con afectación renal se constató una recuperación sin secuelas. De los casos supervivientes con afectación neurológica, al alta hospitalaria todos tuvieron una exploración física normal, salvo el caso N21 que presentaba paresia braquial y síndrome de Horner izquierdos juntos con lesiones residuales de edema en la

ecografía transfontanelar y en la RM cerebral de control realizadas y con PET, potenciales evocados auditivos del tronco cerebral (PEATC) y PEVi normales. El tiempo medio de estancia hospitalaria para los supervivientes ingresados en el Servicio de Neonatología fue de 10,8 días.

En la *Figura 25* se esquematiza la incidencia de la afectación neurológica y extraneurológica en nuestro grupo de casos y en la *Tabla 21* la afectación sistémica y la mortalidad globalmente en la situación de acidosis con $\text{pH} \leq 7,1$ y concretamente en EHI:

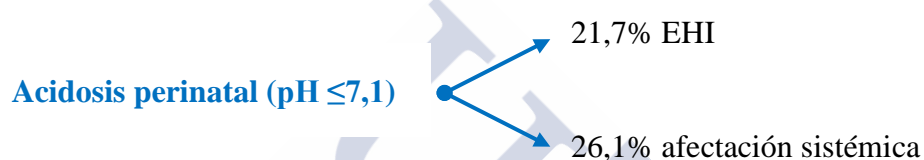


Figura 25: Incidencia de afectación neurológica y extraneurológica en los casos

<i>Afectación sistémica (%)</i>	Acidosis	EHI
<i>Cardiaca</i>	8,7%	40%
<i>Renal</i>	17,4%	40%
<i>Hepática</i>	4,3%	20%
<i>Intestinal</i>	4,3%	0%
<i>Mortalidad (%)</i>	4,3%	20%

Tabla 21: Afectación sistémica y mortalidad en acidosis y EHI

IV.2.2. Actuación sobre el grupo de controles

En el grupo control, 4 (17,4%) requirieron ingreso en el Servicio de Neonatología pero por otras causas no relacionadas con la depresión perinatal (uno para control estricto de las glucemias al ser hijo de madre con diabetes gestacional insulín-dependiente del 2^a trimestre, otro por bajo peso, otro por distrés respiratorio en relación con taquipnea transitoria del recién nacido y otro para tratamiento antibiótico por sospecha de coriamnionitis materna en el que se descartó la infección neonatal). El resto de los controles (82,6%) permanecieron en la planta de hospitalización de la Maternidad junto a sus madres y fueron observados al menos durante 48 horas, presentando buena evolución clínica, siendo la estancia hospitalaria media de 2,5 días.

IV.3. Descriptiva casos-controles

La descriptiva diferencial de casos y controles y la valoración de la significación estadística pueden verse en la *Tabla 22*.

		Casos		Controles		P	P Valor Ajustado
Sexo		10 M (43,48%); 13 V (56,52%)	18 M (78,26%); 5 V (21,74%)			n.s	n.s
Edad gestacional (s)		21 AT; 39,52±2,36	23 AT; 39,66±1,22			n.s	n.s
Peso (g)		3170,87±590	3278,69±437			n.s	n.s
Longitud (cm)		49,08±2,85	49,07±2,41			n.s	n.s
PC (cm)		34,31±2,28	34,33±1,47			n.s	n.s
Edad materna (años)		35,18±4,93	34,74±5,79			n.s	n.s
Apgar1		6,17±2,65	8,87±0,34			4.031e-06	2.12e-5
Apgar5		7,83±2,53	9,87±0,46			2.798e-05	8.39e-5
Fc (lpm)		139,73±21,6	141,45±0,47			n.s	n.s
Tª (°C)		36,51±0,83	36,45±0,47			n.s	n.s
RCP		8 RP; 6 RS; 9 No	1 RP; 22 No			7.537e-05	1.76e-4
pH		6,97±0,14	7,27±0,06			6.373e-09	1.34e-7
Bicarbonato (mmol/L)		17,89±4,16	23,68±2,41			7.366e-06	3.09e-5
EB (mmol/L)		-14,07±5,56	-3,89±2,79			5.039e-08	5.29e-7
Lactato (mmol/L)		9,61±2,93	4,02±1,68			8.804e-08	6.16e-7
Parto		7 Cx (6 Cx Ux); 5 PEV; 11 PI	12Cx (1 CxD); 10 PEV; 1 PI			0.003669 (3 niveles) 0.2078 (PEV vs otros)	0.00734 (3 niveles)
Lactato 1h		9,51±5,97	-				
Lactato 24h		2,31±0,68	-				
Glutamato (μmol/L)		151,32±99,31	63,62±25,23			1.662e-05	5.82e-5
GOT (UI/L)		83,34±59,68	34,77±17,79			6.429e-05	4.69e-4
GPT (UI/L)		24,29±26,73	10,37±5,89			n.s	n.s
GGT (UI/L)		160,29±80,79	185,59±139,19			n.s	n.s
CK (UI/L)		145,83±125,5	107,74±65,12			n.s	n.s
Indicador de riesgo		17 SI; 6 NO	4 SI; 19 NO			2.75e-4	5.78e-4
Agresión hipóxico-isiémica		11 SI; 12 NO	-				
EHI		5 SI; 18 NO	-				
Asfixia perinatal/ EHI “significativa”		2 SI; 21 NO	-				
Compromiso sistémico		6 SI; 17 NO	-				

Tabla 22: Descriptiva diferencial de casos y controles y valoración de la significación estadística.

(M: Mujer; V: Varón; n.s: No significativo; AT: A término; PC: Perímetro de cráneo; s: Semanas; Apgar1: Apgar al minuto de vida; Apgar5: Apgar a los 5 minutos de vida; Fc: Frecuencia cardíaca; lpm: Latidos por minuto; Tª: Temperatura; RCP: Reanimación cardiopulmonar; RP: Reanimación profunda; RS: Reanimación superficial; EB: Exceso de bases; Cx: Cesárea; Cx Ux: Cesárea urgente; CxD: Cesárea por parto detenido; PI: Parto instrumentalizado; PEV: Parto eutócico de vértice; GOT: Transaminasa glutámico-oxaloacética; GPT: Transaminasa glutámico-pirúvica; GGT: Gamma glutamil transpeptidasa; CK: Creatina kinasa; EHI: Encefalopatía hipóxico-isiémica

No se encontraron diferencias significativas entre el grupo de casos y controles para el sexo, edad gestacional, peso, longitud, PC, edad materna, Fc y T^a.

Los casos con pH $\leq 7,1$ tuvieron puntuaciones menores de Apgar1 y Apgar5 que los controles con pH $> 7,1$ y con una mayor significación estadística para el Apgar1 ($P=2.12e-5$ y $P=8.39e-5$, respectivamente) (Figura 26).

Los RN con pH $\leq 7,1$ precisaron con más frecuencia reanimación al nacimiento que los controles, con una diferencia significativa ($P=1.76e-4$) (Figura 27).

Las concentraciones de bicarbonato fueron menores en los casos que en los controles ($P=3.09e-5$). El déficit de bases fue mayor para los RN con pH $\leq 7,1$ que para los RN con pH $> 7,1$ ($P=5.29e-7$) (Figura 28).

Los niveles de láctico al nacimiento fueron más del doble en los casos con pH $\leq 7,1$ en comparación con los controles ($P=6.16e-7$) (Figura 29).

Hubo diferencias significativas en el tipo de parto entre el grupo de casos y controles ($P=0.00734$), destacándose la mayor incidencia de PI en el grupo de casos y Cx en el grupo de controles (Figura 30).

La presencia de algún indicador de riesgo de hipoxia-isquemia perinatal fue mayor en el grupo de casos que en el de controles ($P=5.78e-4$) (Figura 31).

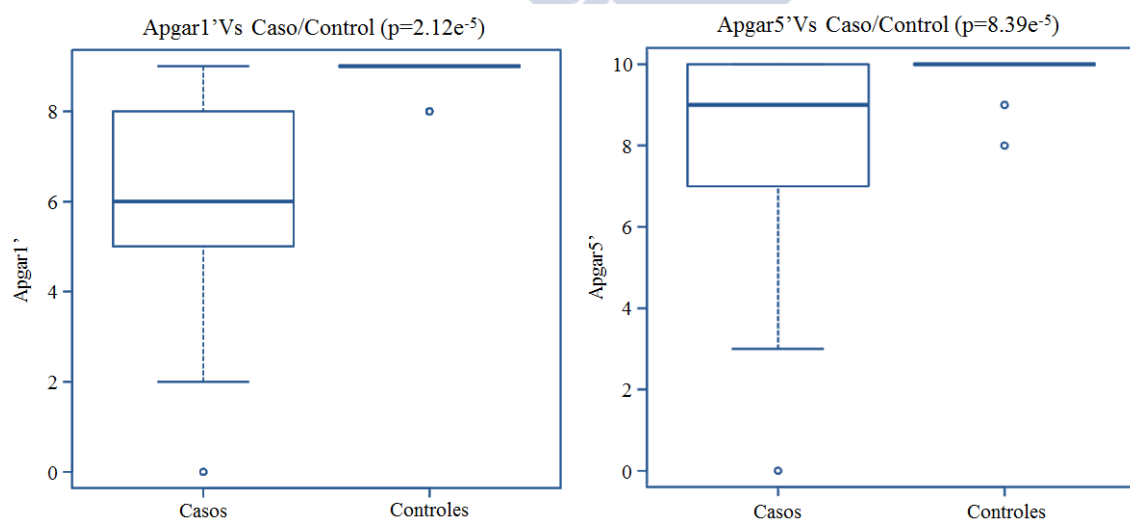


Figura 26: Apgar1 y Apgar5 vs casos/ controles

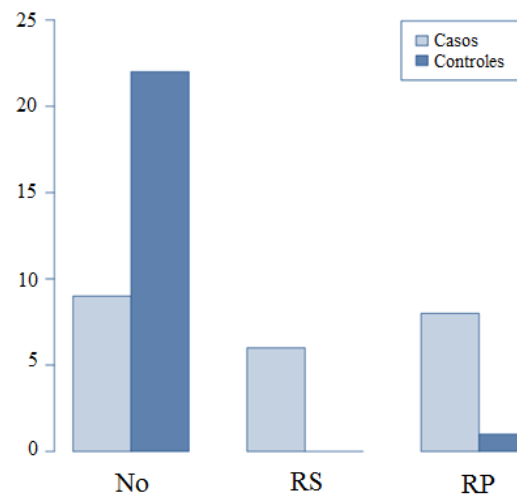
Reanimación Vs Caso/Control ($p=1.76e^{-4}$)

Figura 27: RCP vs casos/ controles (RS: Reanimación superficial; RP: Reanimación profunda)

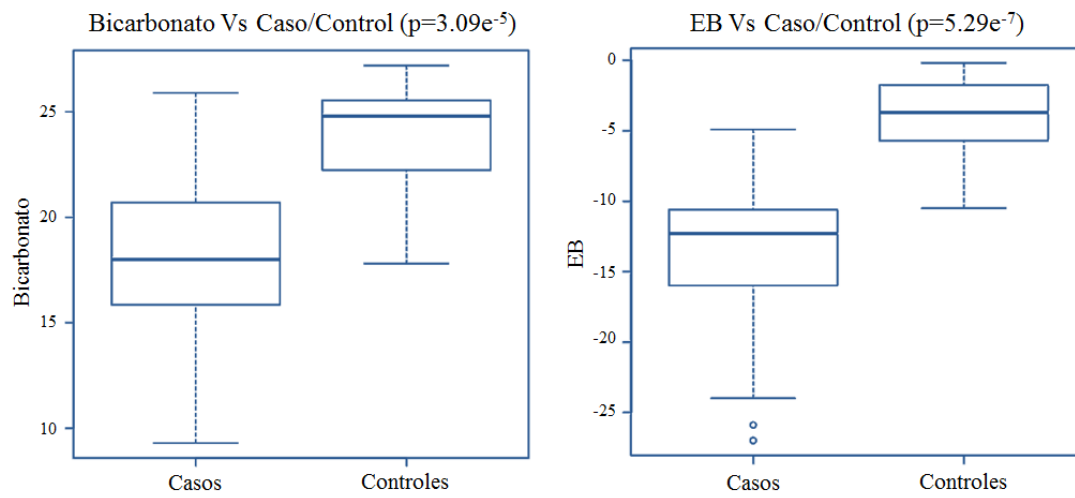


Figura 28: Bicarbonato y EB vs casos/ controles

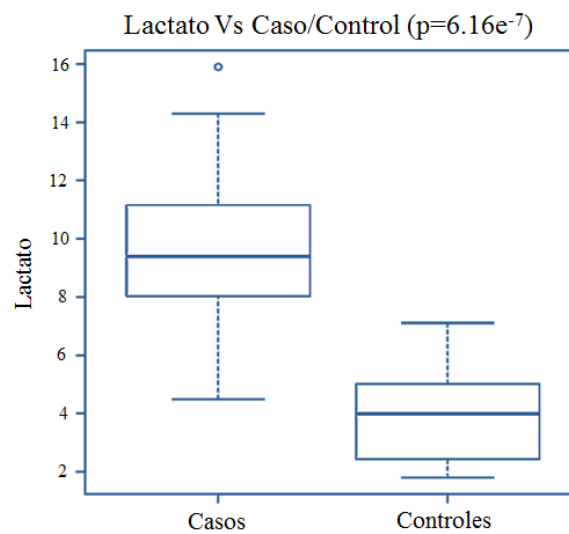


Figura 29: Lactato vs casos/ controles

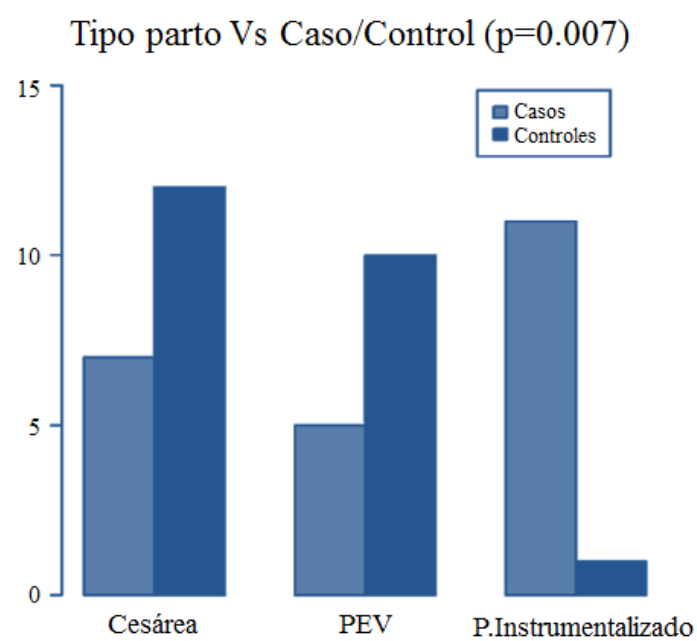


Figura 30: Tipo de parto vs casos/ controles

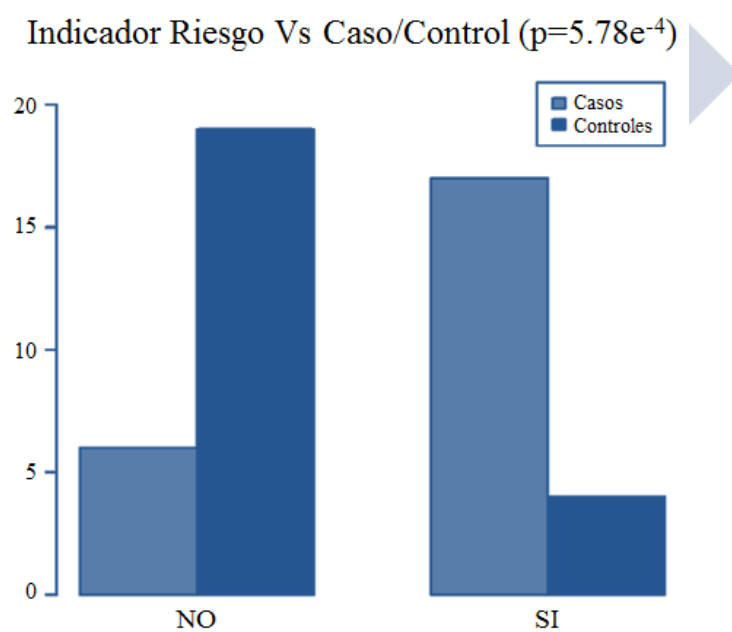


Figura 31: Indicador de riesgo de hipoxia-isquemia vs casos/ controles

IV.4. Comparación del pH vs otras variables de estudio

Al valorar la relación entre el pH y otras variables obtuvimos los siguientes resultados, reflejados en la *Tabla 23*:

	pH (P)	P Valor Ajustado
SEXO	P=0.01199 M: 7,18±0,13 V: 7,02±0,22	0.022
PESO	n.s	n.s
EDAD GESTACIONAL	n.s	n.s
TIPO DE PARTO	n.s Cx: 7,13±0,21 PEV: 7,18±0,17 PI: 7,03±0,12	n.s
RCP	P=0.0006671 RP: 6,92±0,24 RS: 7±0,1 No: 7,2±0,12	0.0018
APGAR1	P=1.94e-7 cor=0.681	2.13e-6
APGAR5	P=5.891e-7 cor=0.66	3.24e-6
LACTATO	P=6.779e-12 cor=-0.8129	8.135e-11

Tabla 23: Relación entre el pH y otras variables de estudio.

(M: Mujer; V: Varón; n.s: No significativo; Cx: Cesárea; PEV: Parto eutócico de vértice; PI: Parto instrumentalizado; RCP: Reanimación cardiopulmonar; RP: Reanimación profunda; RS: Reanimación superficial; Apgar1: Apgar al minuto de vida. Apgar5: Apgar a los 5 minutos de vida)

Se objetivó una relación significativa entre el sexo y el pH (P=0.022) de forma que los V tuvieron cifras menores de pH que las M (M: 7,18±0,13 y V: 7,02±0,22), lo que no se justifica por la mayor inclusión de V en el grupo de casos pues la diferencia por sexos entre el grupo de casos y controles no es significativa (*Figura 32*).

No hemos encontrado relación entre el pH y el peso al nacimiento ni entre el pH y la edad gestacional.

Aunque los pacientes nacidos por PI fueron los que tuvieron las cifras más bajas de pH ($7,03 \pm 0,12$), seguidos por los nacidos por Cx ($7,13 \pm 0,21$) y por último, por los nacidos por PEV ($7,18 \pm 0,17$), no hallamos relación significativa entre el pH y el tipo de parto.

Observamos una relación significativa ($P=0.0018$) entre el pH y la necesidad de reanimación al nacimiento, de forma que los niños con necesidad de RP son los que presentaron las cifras más bajas de pH ($6,92 \pm 0,24$), seguidos por lo que precisaron RS ($7 \pm 0,1$) y por los que no necesitaron reanimación ($7,2 \pm 0,12$) (*Figura 33*).

Se objetivó una correlación positiva entre el pH y la puntuación Apgar1 y Apgar5 ($P=2.13e-6$, $cor=0.681$ y $P=3.24e-6$, $cor=0.66$, respectivamente), presentando los neonatos con cifras mayores de pH (menos acidóticos) puntuaciones superiores Apgar1 y Apgar5 (*Figura 34*).

Por el contrario, hay una correlación negativa entre el pH y las cifras de lactato ($P=8.135e-11$, $cor=-0.8129$), de forma que a mayor acidosis (menor pH) mayores son las cifras de lactato (*Figura 35*).

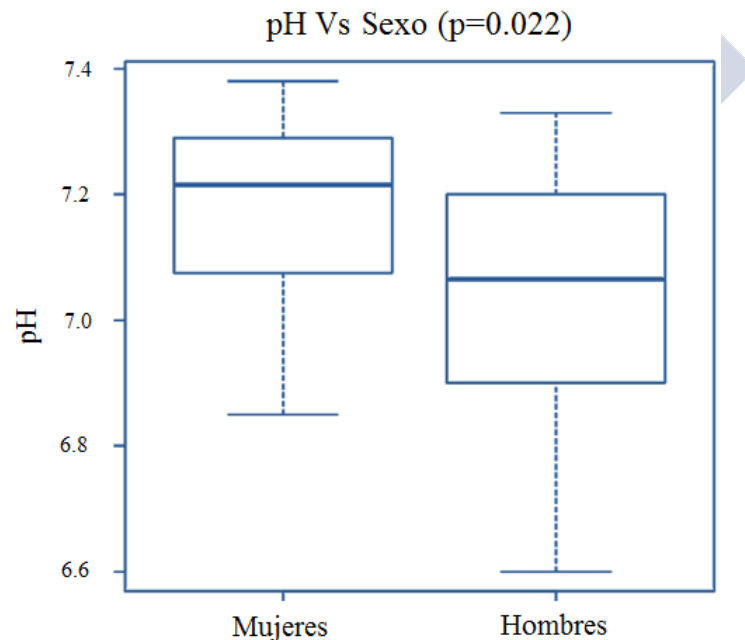


Figura 32: pH vs sexo

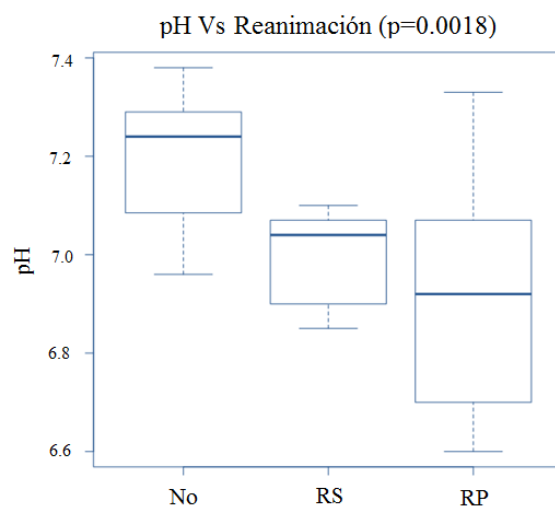


Figura 33: pH vs necesidad de reanimación al nacimiento.
(RS: Reanimación superficial; RP: Reanimación profunda)

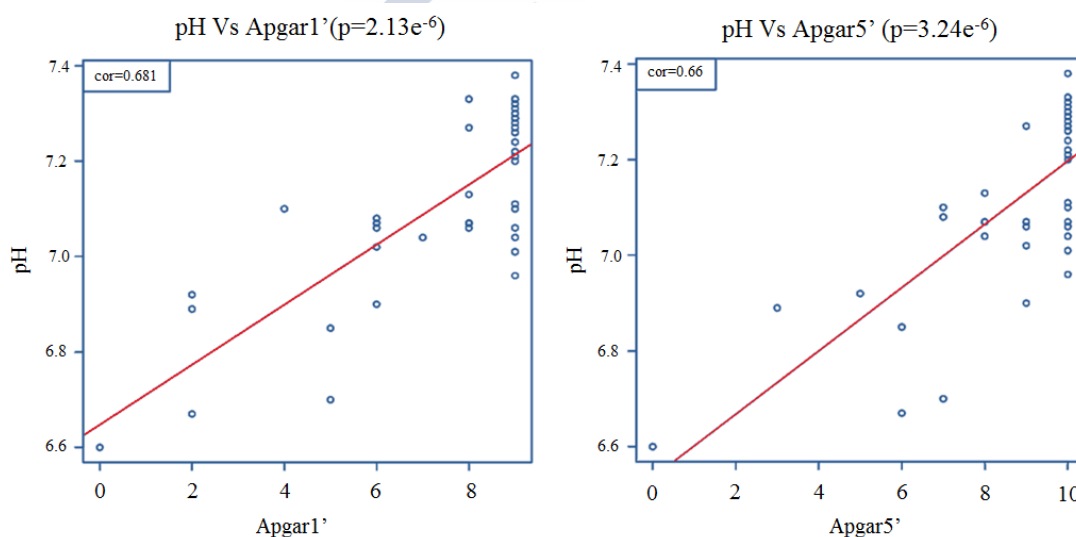


Figura 34: pH vs puntuaciones Apgar1 y Apgar5

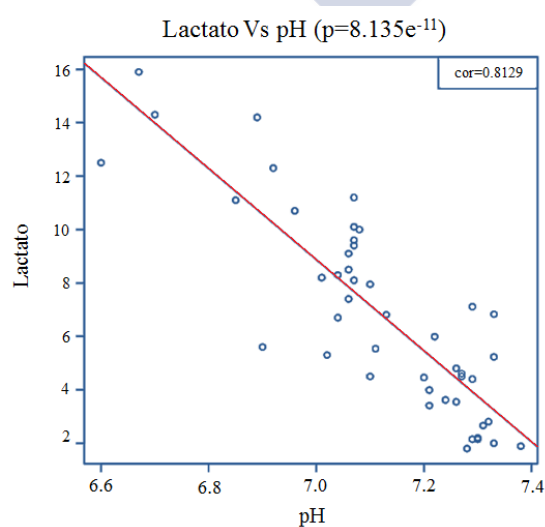


Figura 35: pH vs lactato

IV.5. Comparación del lactato vs otras variables de estudio

Como marcador de daño isquémico, también hemos analizado la relación entre el lactato y otras variables de estudio (Tabla 24).

	Lactato (P)	P Valor Ajustado
SEXO	P=0.02369 M: 5,67±2,65 V: 8,60±4,38	0.0355
PESO	n.s	n.s
EDAD GESTACIONAL	n.s	n.s
TIPO DE PARTO	P=0.004346 Cx: 5,65±3,98 PEV: 6,08±2,92 PI: 9,58±2,69	0.00745
RCP	P=5.089e-05 RP: 11,63±3,1 RS: 8,19±2,37 No: 5,15±2,58	1.53e-4
APGAR1	P=1.395e-08 cor=-0.723	8.37e-8
APGAR5	P=2.508e-07 cor=-0.676	1.003e-6

Tabla 24: Relación entre el lactato y otras variables de estudio.

(M: Mujer; V: Varón; n.s: No significativo; Cx: Cesárea; PEV: Parto eutócico de vértice; PI: Parto instrumentalizado; RCP: Reanimación cardiopulmonar; RP: Reanimación profunda; RS: Reanimación superficial; Apgar1: Apgar al minuto de vida; Apgar5: Apgar a los 5 minutos de vida)

Como para el pH, los V tuvieron cifras mayores de láctico que las M con una diferencia significativa (M: 5,67±2,65 vs V: 8,6±4,38, P=0.0355) (Figura 36).

No encontramos relación entre las concentraciones de lactato y el peso al nacimiento, ni entre el lactato y la edad gestacional.

A diferencia de para el pH, si hubo relación entre el tipo de parto y las concentraciones de lactato, de forma que los niños nacidos por PI son los que presentaron las mayores concentraciones, seguidos por los nacidos por PEV y por los nacidos por Cx (PI 9,58±2,69, PEV 6,08±2,92, Cx 5,65±3,98, respectivamente, P=0.00745) (Figura 37).

Los RN que precisaron reanimación tuvieron concentraciones mayores de láctico al nacimiento (RP $11,63 \pm 3,1$; RS $8,19 \pm 2,37$; no R $5,15 \pm 2,58$; $P=1.53e-4$) (Figura 38).

Objetivamos una correlación negativa entre Apgar1 y Apgar5 y las cifras de lactato, de forma que los pacientes con Apgar más bajos tuvieron mayores niveles de láctico (cor-0.723, $P=8.37e-8$ para Apgar1 y cor-0.676, $P=1.003e-6$ para Apgar5) (Figura 39).

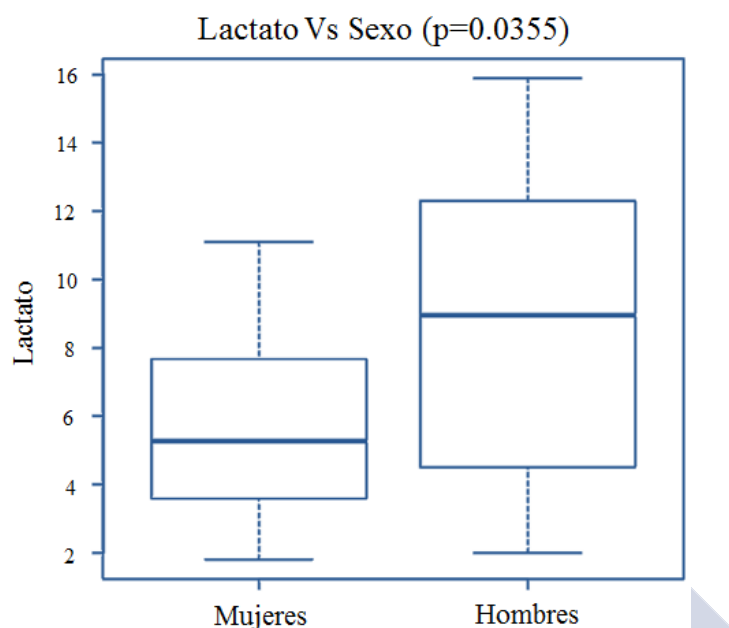


Figura 36: Lactato vs sexo

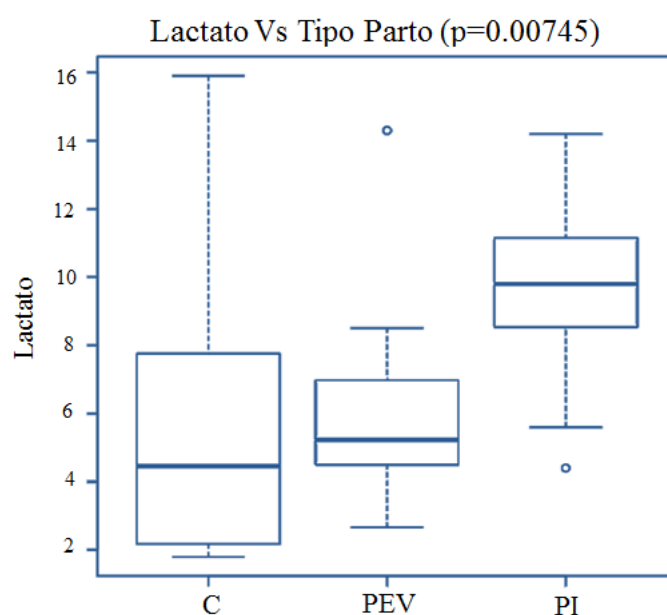


Figura 37: Lactato vs tipo de parto

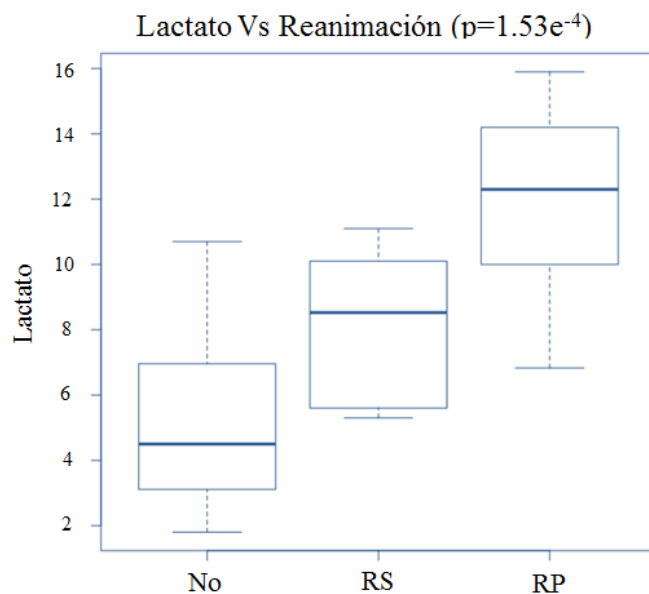


Figura 38: Lactato vs necesidad de reanimación al nacimiento.
(RS: Reanimación superficial; RP: Reanimación profunda)

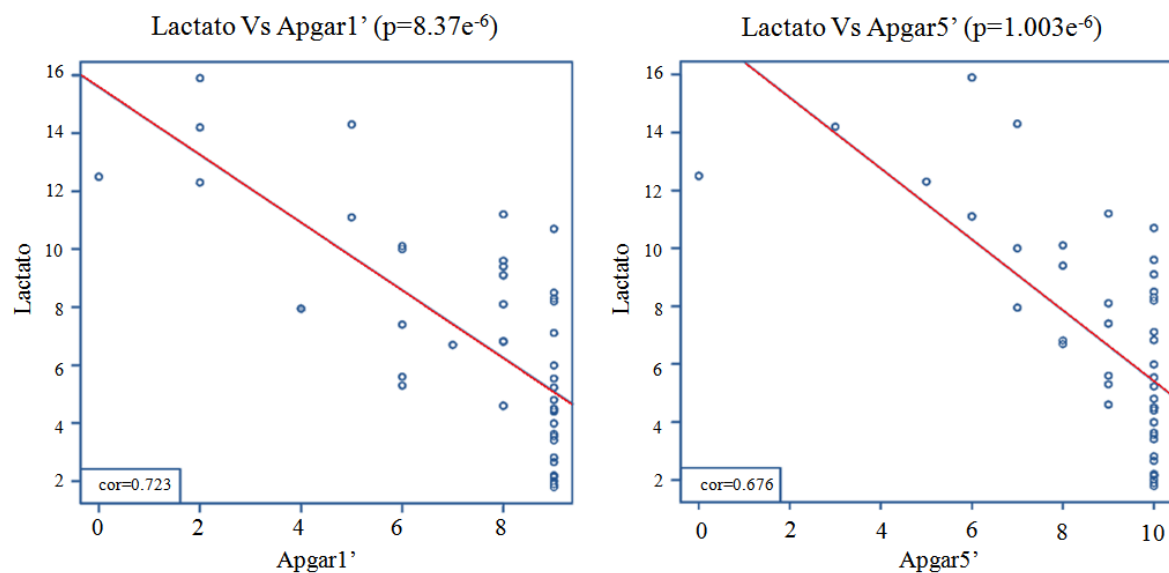


Figura 39: Lactato vs Apgar1 y Apgar5

IV.6. Análisis de glutamato, GOT, GPT, GGT y CK

IV.6.1. Comparación entre casos y controles

El análisis descriptivo entre casos y controles para el glutamato, las transaminasas y la CK puede verse en la *Tabla 25* y en la *Figura 40* y muestra los siguientes datos:

	Casos	Controles	P	P Valor Ajustado
GLUTAMATO ($\mu\text{mol/L}$)	151,32 \pm 99	63,62 \pm 25	1.662e-5	5.82e-5
GOT (UI/L)	83,34 \pm 59	34,77 \pm 17	6.429e-5	4.69e-4
GPT (UI/L)	24,29 \pm 26	10,37 \pm 5	n.s	n.s
GGT (UI/L)	160,29 \pm 80	185,59 \pm 139	n.s	n.s
CK (UI/L)	145,83 \pm 125	107,74 \pm 65	n.s	n.s

Tabla 25: Análisis de glutamato, transaminasas y CK. Comparativa entre casos y controles y significación estadística.

(GOT: Transaminasa glutámico-oxaloacética; GPT: Transaminasa glutámico-pirúvica; GGT: Gamma glutamil transpeptidasa; CK: Creatina kinasa; n.s: No significativo)

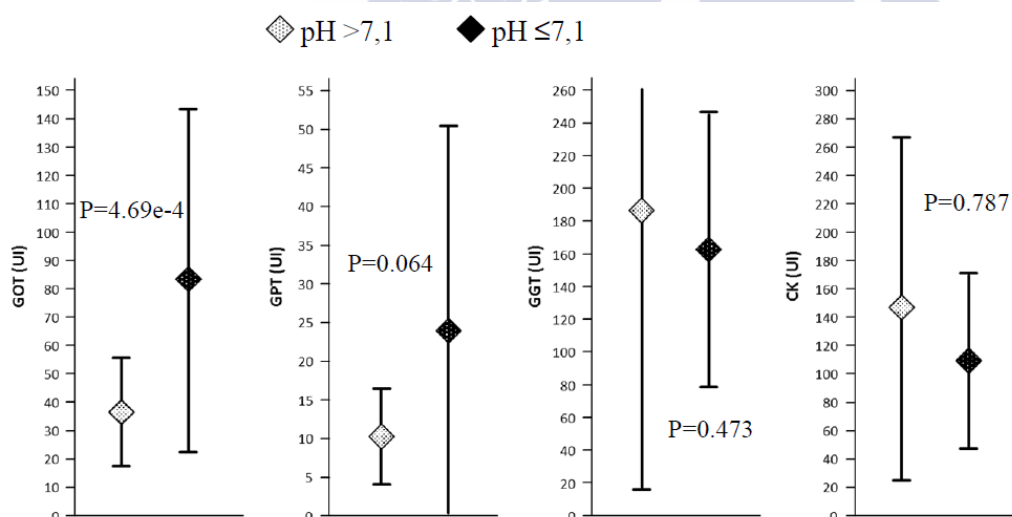


Figura 40: Análisis de transaminasas y CK. Comparativa entre casos y controles y significación estadística. (GOT: Transaminasa glutámico-oxaloacética; GPT: Transaminasa glutámico-pirúvica; GGT: Gamma glutamil transpeptidasa; CK: Creatina kinasa)

Los niveles de glutamato obtenidos fueron más del doble en el grupo de casos con pH $\leq 7,1$ que en el de controles (151,32 \pm 99,31 y 63,62 \pm 25,23 $\mu\text{mol/L}$, respectivamente),

siendo la diferencia significativa ($P=5.82e-5$) (Figura 41).

Los casos tuvieron asimismo concentraciones más elevadas de GOT que los controles ($83,34 \pm 59,68$ vs $34,77 \pm 17,79$ UI/L, $P=4.69e-4$) (Figura 42).

No hubo en cambio diferencias significativas en las concentraciones de GPT ($24,29 \pm 26,73$ vs $10,37 \pm 5,89$ UI/L) ni de GGT ($160,29 \pm 80,79$ vs $185,59 \pm 139,19$ UI/L) entre los casos y los controles.

Tampoco encontramos diferencias en las concentraciones de CK entre los casos y los controles ($145,83 \pm 125,5$ vs $107,74 \pm 65,12$ UI/L).

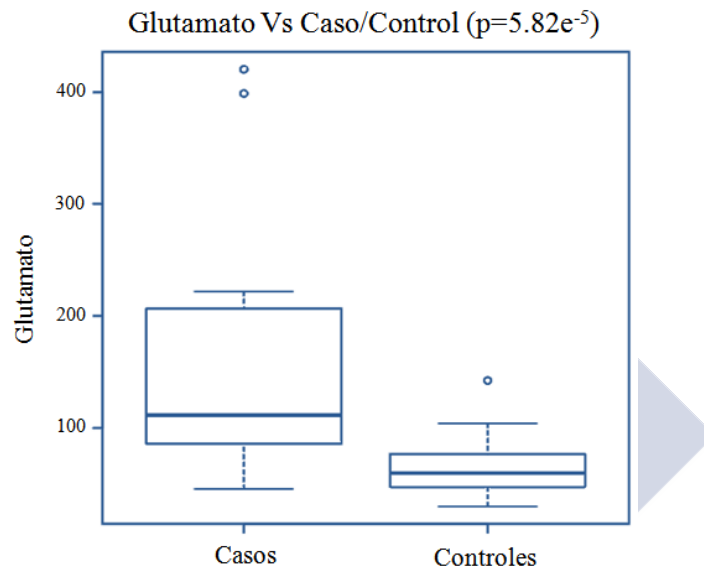


Figura 41: Glutamato vs casos/ controles

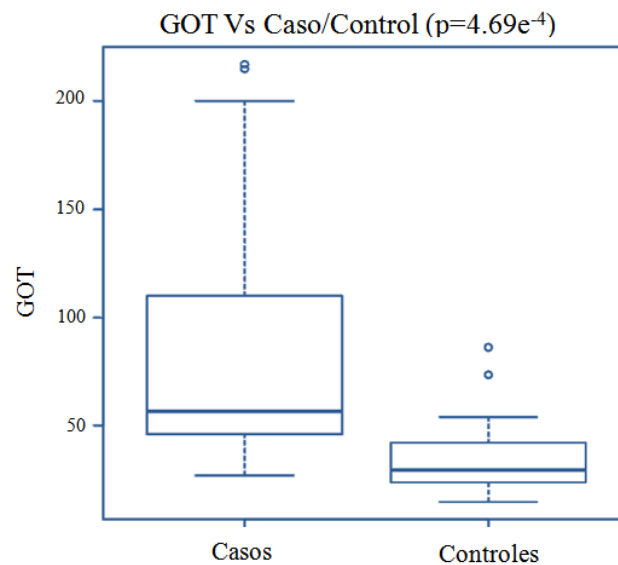


Figura 42: GOT vs casos/ controles

IV.6.2. Glutamato vs otras variables de estudio

En la *Tabla 26* se observa la relación entre el glutamato y el sexo, el peso, el tipo de parto, el pH, el lactato y el Apgar5.

	Glutamato (P)	P Valor Ajustado
SEXO	n.s M: 110,94±100,27 V: 102,08±52,64	n.s
PESO	n.s	n.s
TIPO DE PARTO	n.s Cx: 102,13±91,35 PEV: 94,83±92,74 PI: 131,74±59,38	n.s
pH	P=6.621e-05 cor=-0.553	2.43e-4
LACTATO	P=0.0006222 cor=0.486	0.0012
APGAR5	cor=-0.392	0.007

Tabla 26: Relación entre el glutamato y otras variables de estudio.

(M: Mujer; V: Varón; n.s: No significativo; Cx: Cesárea; PEV: Parto eutócico de vértice; PI: Parto instrumentalizado; Apgar5: Apgar a los 5 minutos de vida)

No hemos objetivado diferencias significativas en las concentraciones de glutamato según el sexo (M: 110,94±100,27 $\mu\text{mol/L}$ y V: 102,08±52,64 $\mu\text{mol/L}$, $P>0.05$) ni de acuerdo al peso (cor=-0.0827, $P>0.05$).

Las cifras de glutamato tampoco guardan una correlación significativa con el tipo de parto.

Existe una correlación negativa entre el pH y las concentraciones de glutamato (cor=-0.553, $P=2.43\text{e-}4$), de forma que a menor pH mayores son las concentraciones de glutamato y viceversa (*Figura 43*).

Existe una correlación positiva entre las concentraciones de lactato y glutamato, de forma que los neonatos con niveles mayores de lactato presentan valores mayores de glutamato (cor=0.486, $P=0.0012$) (*Figura 44*).

Existe una correlación negativa entre los niveles de glutamato y la puntuación Apgar5 ($\text{cor}=-0.233$; $P=0.007$), teniendo los niños con Apgar más bajos concentraciones más altas de glutamato y viceversa (*Figura 45*).

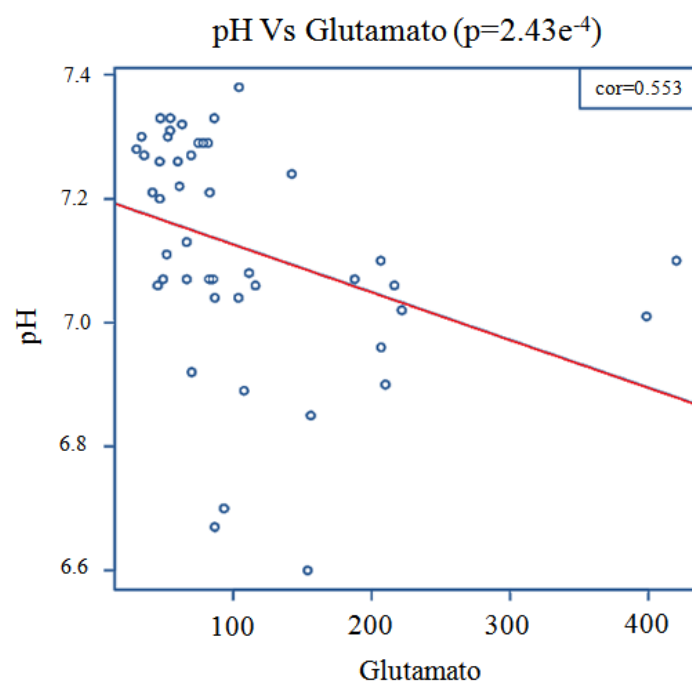


Figura 43: Glutamato vs pH

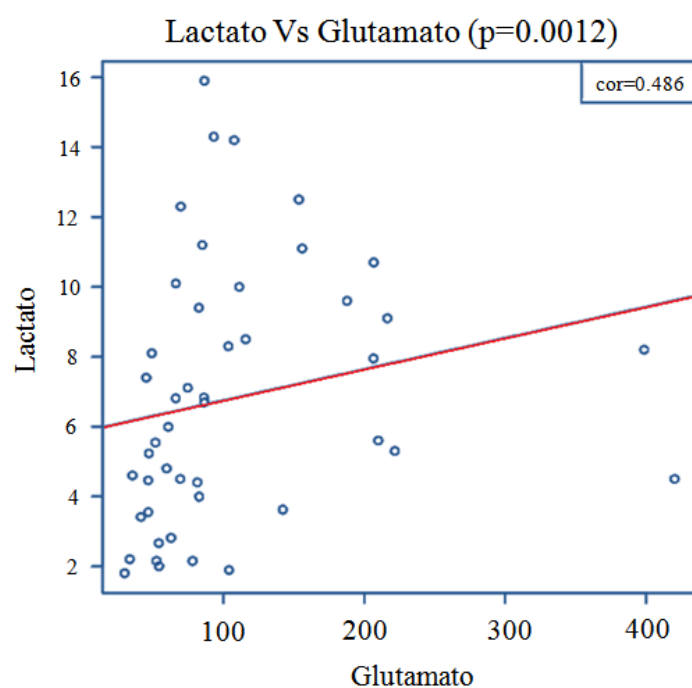


Figura 44: Glutamato vs lactato

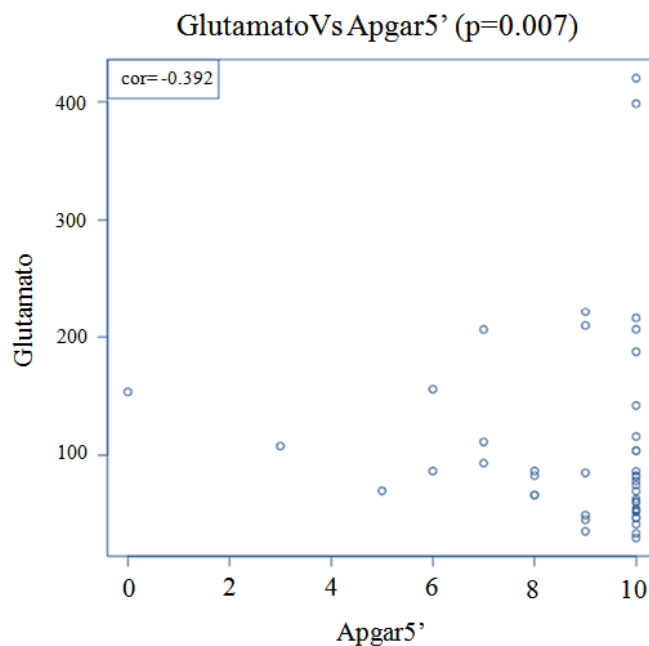


Figura 45: Glutamato vs Apgar5

IV.6.3. GOT vs otras variables de estudio

En la Tabla 27 puede verse la correlación entre las concentraciones de GOT y el sexo, el peso, el tipo de parto, el lactato, el Apgar5 y el glutamato.

	GOT (P)	P Valor Ajustado
SEXO	n.s M: 49,06±39,17 V: 74,08±61,35	n.s
PESO	n.s	n.s
TIPO DE PARTO	P=0.01604 Cx: 45,8±47,89 PEV: 56,45±36,89 PI: 80,17±61,52	0.032
pH	P=0.002258 cor=-0.444	0.00497
LACTATO	P=0.0002813 cor=0.516	6.75e-4
APGAR5	P=2.972e-5 cor=-0.5799	1.34e-4
GLUTAMATO	P=6.538e-6 cor=0.6164	3.92e-5

Tabla 27: Relación entre GOT y otras variables de estudio.

(GOT: Transaminasa glutámico-oxaloacética; M: Mujer; V: Varón; n.s: No significativo; Cx: Cesárea; PEV: Parto eutócico de vértice; PI: Parto instrumentalizado; Apgar5: Apgar a los 5 minutos de vida)

No se objetivó correlación entre las concentraciones de GOT y el sexo ni con el peso.

Se objetivó una correlación menor entre las concentraciones de GOT y el tipo de parto, de forma que los pacientes nacidos por PI tuvieron las cifras mayores de GOT, seguidos por los nacidos por PEV y por Cx (PI $80,17 \pm 61,52$ UI/L; PEV $56,45 \pm 36,89$ UI/L y Cx $45,8 \pm 47,89$ UI/L respectivamente, $P=0.032$) (*Figura 46*).

Existe una correlación negativa entre las concentraciones de GOT y los valores del pH ($\text{cor}=-0.444$; $P=0.00497$), de forma que los niños con menores cifras de pH tienen valores más altos de GOT y viceversa (*Figura 47*).

Se encontró una correlación positiva entre el lactato y las concentraciones de GOT, de forma que los RN con mayores valores de lactato tuvieron concentraciones más altas de GOT ($\text{cor}=0.516$, $P=6.75e-4$) (*Figura 48*).

Existe una correlación negativa entre las concentraciones de GOT y la puntuación Apgar5 ($\text{cor}=-0.5799$, $P=1.34e-4$), así es que los niños con puntuaciones más bajas tienen concentraciones más altas de GOT y viceversa (*Figura 49*).

Se encontró una correlación positiva entre los niveles de glutamato y de GOT ($\text{cor}=0.616$; $P=3.92e-5$), de forma que a mayores concentraciones de glutamato mayores concentraciones de GOT y viceversa (*Figura 50*).

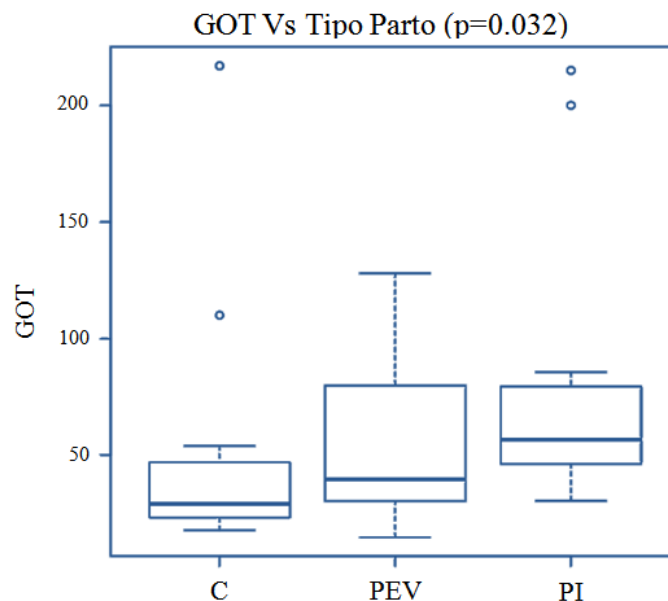


Figura 46: GOT y tipo de parto

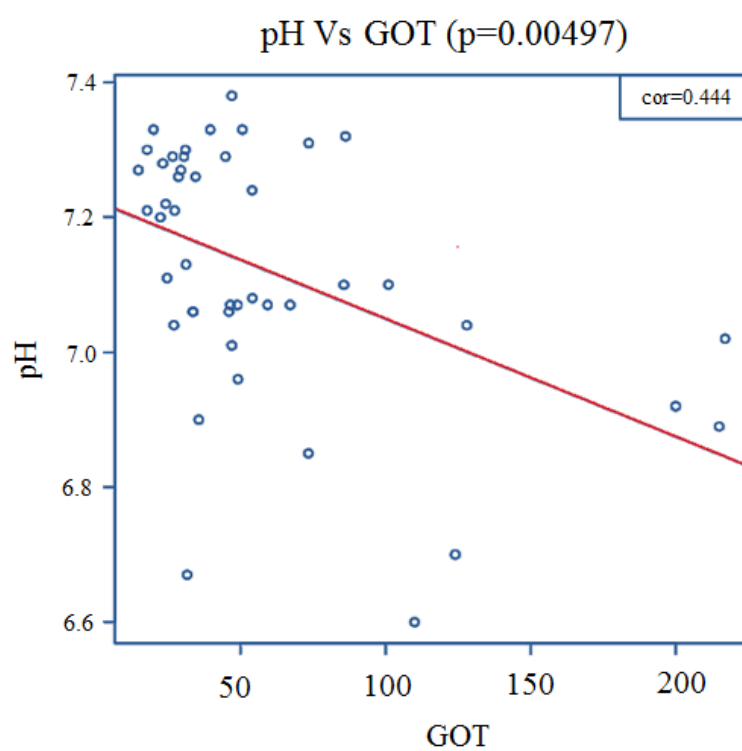


Figura 47: GOT vs pH

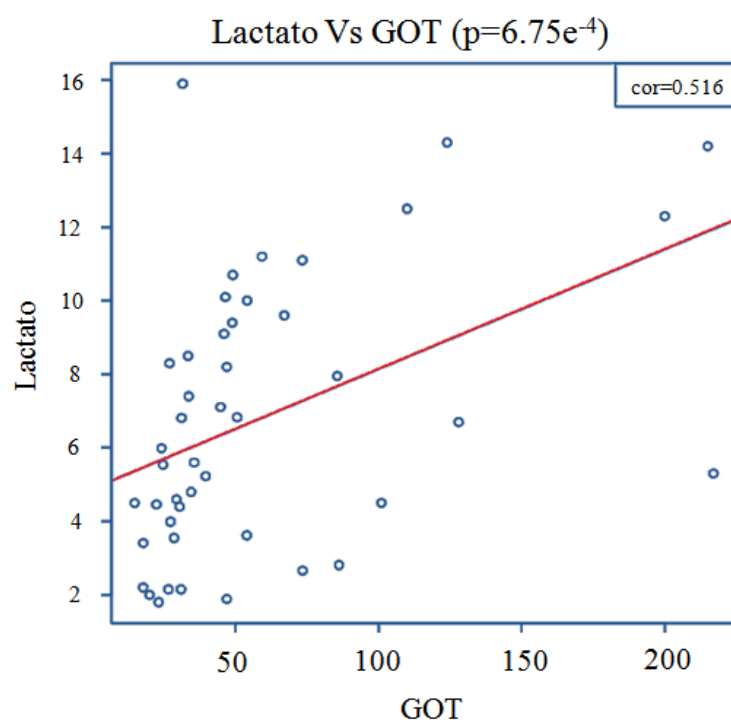


Figura 48: GOT vs lactato

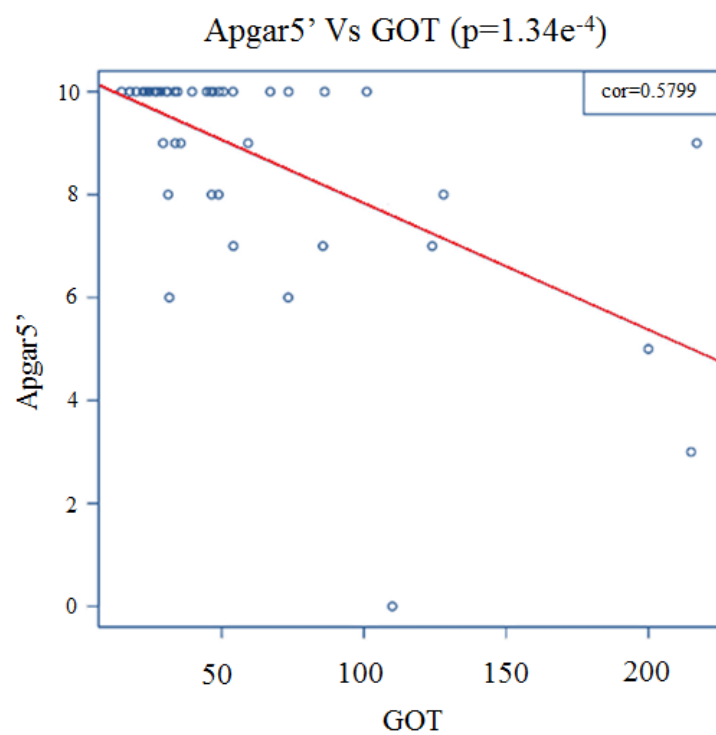


Figura 49: GOT y Apgar5

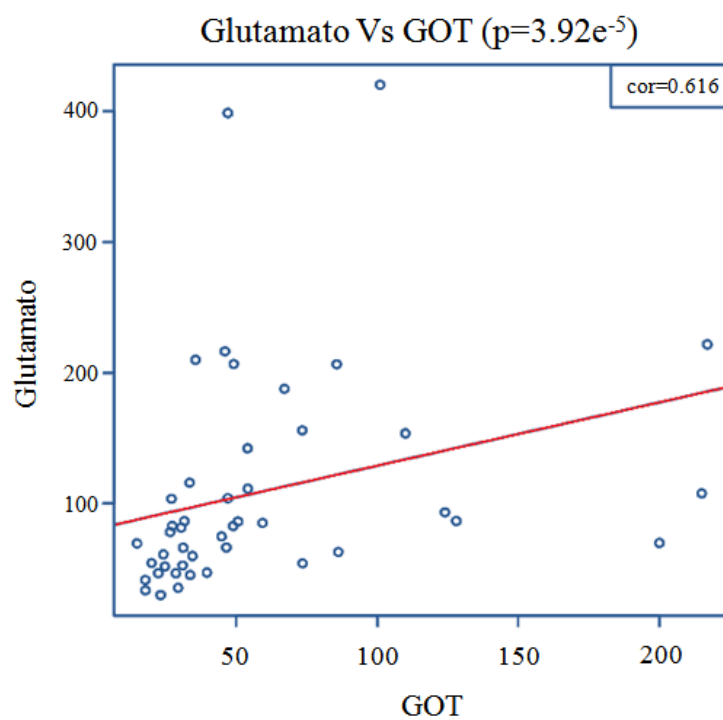


Figura 50: GOT vs glutamato

IV.6.4. GPT vs otras variables de estudio

Al correlacionar la GPT con el resto de variables de estudio, obtuvimos los siguientes resultados reflejados en la *Tabla 28*:

	GPT (P)	P Valor Ajustado
SEXO	n.s M: 14,31±17,48 V: 20,83±22,84	n.s
PESO	n.s	n.s
TIPO DE PARTO	n.s	n.s
pH	P=0.01278 cor=-0.4166	0.02
LACTATO	n.s	n.s
APGAR5	n.s	n.s
GLUTAMATO	n.s	n.s

Tabla 28: GPT vs otras variables de estudio.

(GPT: Transaminasa glutámico-pirúvica; M: Mujer; V: Varón; n.s: No significativo; Apgar5: Apgar a los 5 minutos de vida)

No hemos objetivado correlación entre las concentraciones de GPT y el sexo o peso al nacimiento ni con el tipo de parto.

Encontramos una correlación menor que para la GOT entre las concentraciones de GPT y el pH, de forma que a menor pH mayores son las concentraciones de GPT y viceversa (cor=-0.4166; P=0.02) (*Figura 51*). Por el contrario, no se halló correlación entre las concentraciones de GPT y el lactato (cor=0.2278) ni con las puntuaciones Apgar5 (cor=-0.3815) ni con el glutamato (cor= 0.119).

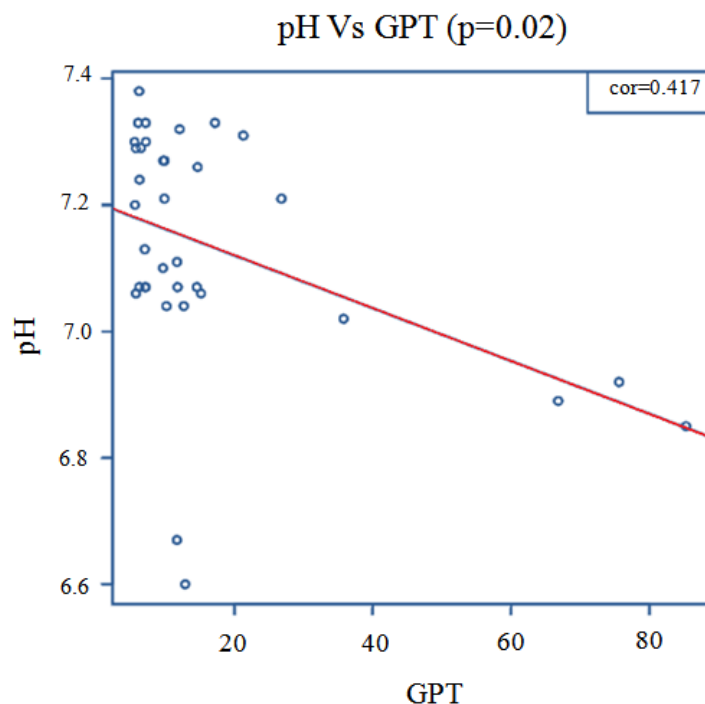


Figura 51: GPT vs pH

IV.6.5. GGT vs otras variables de estudio

En cuanto al análisis de la GGT, no hemos objetivado correlación entre las cifras de dicha enzima y ninguna de las variables de estudio (Tabla 29).

	GGT (P)	P Valor Ajustado
SEXO	n.s M: 166,77±94 V: 183,11±141,57	n.s
PESO	n.s	n.s
TIPO DE PARTO	n.s Cx: 185,46±93,19 PEV: 161,8±145,93 PI: 167,78±107,22	n.s
pH	n.s	n.s
LACTATO	n.s	n.s
APGAR5	n.s	n.s
GLUTAMATO	n.s	n.s

Tabla 29: Relación entre la GGT y otras variables de estudio.

(GGT: Gamma glutamil transpeptidasa; M: Mujer; V: Varón; n.s: No significativo; Cx: Cesárea; PEV: Parto eutócico de vértice; PI: Parto instrumentalizado; Apgar5: Apgar a los 5 minutos de vida)

IV.6.6. CK vs otras variables de estudio

Tampoco hemos observado ninguna correlación entre las concentraciones de CK y las variables de estudio (*Tabla 30*).

	CK (P)	P Valor Ajustado
SEXO	n.s M: 128,41±111,85 V: 116,85±61,51	n.s
PESO	n.s	n.s
TIPO DE PARTO	n.s CX: 121,28±83,49 PEV: 102,76±81,37 PI: 158,41±133,3	n.s
pH	n.s	n.s
LACTATO	n.s	n.s
APGAR5	n.s	n.s
GLUTAMATO	n.s	n.s

Tabla 30: Relación entre la CK y otras variables de estudio.

(CK: Creatina kinasa; M: Mujer; V: Varón; n.s: No significativo; Cx: Cesárea; PEV: Parto eutócico de vértice; PI: Parto instrumentalizado; Apgar5: Apgar a los 5 minutos de vida)

IV.7. Comparación del Apgar5 vs otras variables de estudio

Al analizar la relación existente entre el Apgar5 y las variables de estudio obtuvimos los siguientes resultados, (Tabla 31):

	APGAR5 (P)	P Valor Ajustado
SEXO	n.s M: 9,39±1,13 V: 8±2,85	n.s
PESO	n.s	n.s
EDAD GESTACIONAL	n.s	n.s
RCP	P=8.635e-06 RP: 6,22±3,19 RS: 8,17±1,47 No: 9,74±0,63	7.77e-5
TIPO DE PARTO	P=0.008082 Cx: 9,11±2.4 PEV: 9,47±0.99 PI: 7,67±2.19	0.0242
GOT	P=2.972e-5 cor=-0.5799	1.34e-4
GPT	n.s	n.s
GGT	n.s	n.s
CK	n.s	n.s
GLUTAMATO	P=0.1185 cor=-0.392	0.007

Tabla 31: Relación entre el Apgar5 y otras variables de estudio.

(Apgar5: Apgar a los 5 minutos de vida; M: Mujer; V: Varón; n.s: No significativo; RCP: Reanimación cardiopulmonar; RP: Reanimación profunda; RS: Reanimación superficial; Cx: Cesárea; PEV: Parto eutócico de vértice; PI: Parto instrumentalizado; GOT: Transaminasa glutámico-oxaloacética; GPT: Transaminasa glutámico-pirúvica; GGT: Gamma glutamil transpeptidasa; CK: Creatina kinasa)

Hemos objetivado una relación significativa ($P=7.77e-5$) entre el Apgar5 y la necesidad de reanimación al nacimiento, de forma que los niños que precisaron RP son los que presentaron menores puntuaciones ($6,22\pm3,19$), seguidos por los que precisaron RS ($8,17\pm1,47$), teniendo los pacientes sin necesidad de reanimación al nacimiento las mayores puntuaciones ($9,74\pm0,63$) (Figura 52).

También observamos una relación ($P=0.0242$) entre el tipo de parto y el Apgar5,

teniendo los pacientes nacidos por PEV las mejores puntuaciones ($9,47 \pm 0,99$), seguidos por los nacidos por Cx ($9,11 \pm 2,4$) y por último, por los nacidos por PI ($7,67 \pm 2,19$) (Figura 53).

Como ya se ha descrito previamente, la única enzima relacionada con el Apgar5 fue la GOT ($\text{cor} = -0,5799$, $P = 1,34 \times 10^{-4}$), de forma que los pacientes con mayores puntuaciones tuvieron las concentraciones más bajas de GOT y viceversa (Figura 49), no encontrándose relación para la GPT, la GGT y la CK. Igual que para la GOT, también hemos encontrado una correlación negativa entre el Apgar5 y el glutamato ($\text{cor} = -0,392$, $P = 0,007$) (Figura 45).

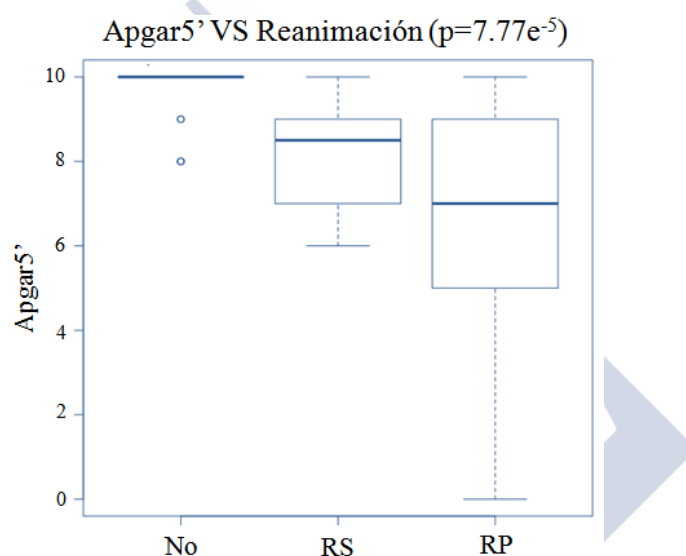


Figura 52: Apgar5 vs reanimación. (RS: Reanimación superficial; RP: Reanimación profunda)

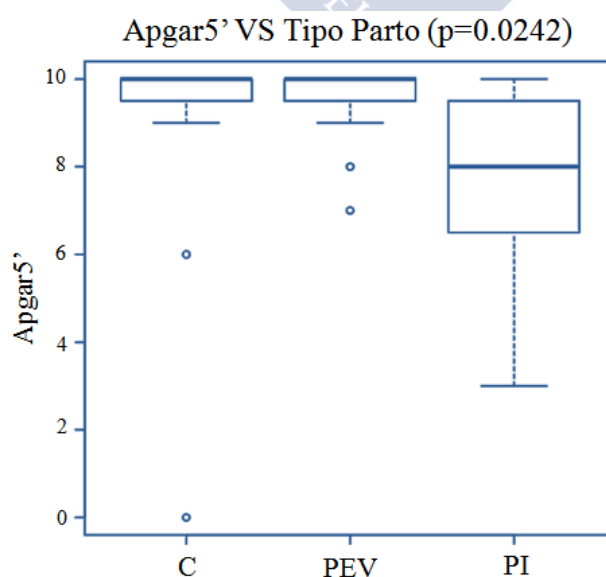


Figura 53: Apgar5 vs tipo de parto

IV.8. Análisis multivariante

IV.8.1. Análisis multivariante para acidosis perinatal

Para determinar la contribución que el glutamato y las enzimas GOT, GPT, GGT y CK tienen en la acidosis, se realiza un análisis multivariante empleando como variable dependiente la acidosis perinatal en riesgo de resultados neurológicos adversos. Vemos que los niveles de glutamato y las puntuaciones Apgar son las únicas variables asociadas a la acidosis perinatal de riesgo y que por cada incremento en 10 $\mu\text{mol/L}$ de glutamato en sangre se multiplica por 2.15 la posibilidad de presentar acidosis perinatal en riesgo de resultados neurológicos adversos. Las concentraciones de GOT, GPT, GGT y CK no están asociadas independientemente con la acidosis perinatal (Tablas 32 y 33).

Modelo 1:

Variable dependiente: Acidosis perinatal

Variables Independientes	OR	IC 95%	P
VARÓN	0.18	0.01-2.42	n.s
Fc	0.99	0.92-1.06	n.s
APGAR	9.97	2.35-106.55	0.012
GLUTAMATO	0.96	0.91-0.98	0.019
Por 10 $\mu\text{mol/L}$ de GLUTAMATO	2.15	1.06 – 4.36	0.034

Tabla 32: Análisis multivariante acidosis perinatal-glutamato

(Fc: Frecuencia cardiaca; n.s: No significativo)

Modelo 2:

Variable dependiente: Acidosis perinatal

Variables Independientes	OR	IC 95%	P
VARÓN	0.39	0.02-8.85	n.s
Fc	0.97	0.90-1.05	n.s
APGAR	0.29	0.09-0.87	0.028
GOT	1.05	1.00-1.11	n.s
GPT	1.03	0.90 - 1.19	n.s
GGT	0.99	0.98 - 1.01	n.s
CK	1.01	0.99 - 1.02	n.s

Tabla 33: Análisis multivariante acidosis perinatal-GOT/ GPT/ GGT/ CK

(Fc: Frecuencia cardiaca; GOT: Transaminasa glutámico-oxaloacética; GPT: Transaminasa glutámico-pirúvica; GGT: Gamma glutamil transpeptidasa; CK: Creatina kinasa; n.s: No significativo)

IV.8.2. Análisis multivariante para glutamato sérico

Al realizar un análisis multivariante empleando como variable dependiente el glutamato sérico y como variables independientes GOT, GPT, GGT y CK, comprobamos nuevamente que la única enzima asociada al glutamato es la GOT (*Tabla 34*).

Variable dependiente: Glutamato sérico

Variables Independientes	Coefficiente Pearson	p
GOT	0.403	0.006
GPT	0.206	n.s
GGT	0.104	n.s
CK	0.072	n.s

Tabla 34: Análisis multivariante Glutamato - GOT/ GPT/ GGT/ CK

(GOT: Transaminasa glutámico-oxaloacética; GPT: Transaminasa glutámico-pirúvica; GGT: Gamma glutamil transpeptidasa; CK: Creatina kinasa; n.s: No significativo)

IV.9. Comparación del pH y las cifras de Glutamato y GOT dentro del grupo de casos

Dada la correlación negativa existente entre el pH y las cifras de glutamato y GOT, hemos analizado si dentro del grupo de casos los que tienen formas más graves a nivel neurológico (cumplen criterios de agresión perinatal y/o EHI) tienen las concentraciones mayores de glutamato y GOT y los niveles menores de pH (mayor acidosis). En este sentido, no hallamos diferencias significativas entre las concentraciones de dichos marcadores y los casos con las formas clínicas más graves, pero hay que tener en cuenta que el tamaño muestral para esta comparación es muy pequeño (*Tabla 35*).

	Agresión Perinatal + EHI	P Valor Ajustado
GLUTAMATO	n.s	
	SI: 105,85±49,12	n.s
	NO: 193,01±116,48	
GOT	n.s	
	SI: 95,02±66,49	n.s
	NO: 73,6±54,35	
pH	n.s	
	SI: 6,897±0,17	n.s
	NO: 7,045±0,053	

Tabla 35: Comparación de pH, glutamato y GOT dentro del grupo de casos.

(GOT: Transaminasa glutámico-oxaloacética; n.s: No significativo)

IV.10.Resultados en términos de mortalidad y neurodesarrollo

Tras realizar el seguimiento clínico y la evaluación neurocognitiva a los 2 años de vida de todos los niños de estudio obtuvimos los siguientes resultados:

De los casos, uno falleció (N8) en las primeras horas de vida en el contexto de EHI moderada-grave y fallo multiorgánico, así es que nuestro ratio de mortalidad para acidosis perinatal fue del 4,3% (1/23) y del 20% para EHI (1/5). Del grupo control ninguno ha fallecido.

Desde el punto de vista del crecimiento, no hubo diferencias significativas de los datos somatométricos entre el grupo de casos y controles a los 24 meses de vida.

Al realizar el seguimiento clínico de los niños durante sus 2 primeros años de vida empleando la información recogida en sus historias clínicas, objetivamos que dentro del grupo de controles a nivel neurológico en 3 se realizó alguna alerta (en N26 se refería un retraso leve del desarrollo desde los 21 meses de vida; en N31 macrocefalia con desarrollo normal debido a hidrocefalia externa benigna y plagiocefalia occipital leve y en N39 a los 3 meses de vida se refería leve retardo en el control cefálico e inestabilidad en prono y a los 2 años, retraso del lenguaje) y a nivel de padecimientos generales, 2 casos ingresaron durante este periodo (N24 por bronquiolitis aguda y N42 por infección respiratoria de vías altas), 4 fueron evaluados en Cardiología (N24 por arteria umbilical única para descartar otras patologías asociadas, N31 y N42 por ductus arterioso persistente, y N44 por soplo inocente) y el control N41 tuvo displasia congénita de caderas. Dentro del grupo de casos, en cuanto al seguimiento neurológico en los casos N10 y N21 se refería hidrocefalia externa benigna con desarrollo normal, y en este último recuperación completa del Síndrome de Horner y la paresia braquial izquierdas. A nivel de padecimientos generales, 2 casos tuvieron patología renal malformativa congénita (N2 un doble sistema renal derecho con reflujo vésico-ureteral grado I y N5 ectopia renal derecha con riñón displásico), 2 ingresaron por infección del tracto urinario (N2 y N14), 4 presentaron intolerancia a proteínas de leche de vaca (N10, N11, N15 y N16), el caso N18 tiene un Síndrome de Brown en ojo derecho y el N9 padece de urticaria crónica.

En la evaluación neurocognitiva, se realizó la escala de desarrollo Bayley III a los 24 meses de vida (edad media de los casos 24 meses y 12 días de vida y de los controles 24 meses y 18 días) a todos los casos posibles y a todos los controles, excepto al N32 por no residir en España y al N43 por no ser posible el contacto con la familia. Las puntuaciones obtenidas en cada uno de los 3 dominios analizados por la escala fueron categorizados, como ya hemos reflejado en el apartado de métodos, por la severidad de la anormalidad basado en la media poblacional 100 ± 15 . No hallamos diferencias significativas entre casos y controles en las puntuaciones medias de cada uno de los 3 dominios analizados (escala cognitiva $112,73 \pm 17,91$ vs $105 \pm 17,82$, $P=0.2338$; escala del lenguaje $108,68 \pm 18,42$ vs $107,38 \pm 24,23$, $P=0.8551$ y escala motora $111,36 \pm 13,73$ vs $109,24 \pm 14,27$, $P=0.8741$, respectivamente). Dentro de los casos, todos presentaron a nivel cognitivo y motor puntuaciones ≥ 85 puntos, congruentes con un desarrollo normal y un 9,1% (2/22) tuvieron un trastorno moderado del lenguaje. Dentro del grupo de controles, un 90,5% tuvieron puntuaciones ≥ 85 en la escala cognitiva y del 9,5% restante, un 4,8% (1/21) tuvieron un trastorno moderado y un 4,8% (1/21) grave; a nivel del lenguaje el 9,5 % (2/21) tuvieron puntuaciones < 70 , compatibles con un trastorno del lenguaje grave y a nivel motor, un 95,2 % tuvieron puntuaciones ≥ 85 (normal) y el 4,8% (1/21) restante entre 70-84, compatibles con un trastorno motor moderado. Globalmente, teniendo en cuenta ambos grupos, un 4,6% (2/43) presentó alteración del desarrollo cognitivo, un 9,3% (4/43) trastorno del lenguaje y un 2,3% (1/43) alteración motora. Concretamente, en el grupo de casos son los N5 y N6, no afectados de EHI, los que presentan un trastorno aislado del lenguaje con puntuaciones compuestas de 71 y 79 respectivamente y con desarrollo cognitivo y motor normal, en seguimiento en Neuropediatría actualmente y con el diagnóstico inicial de Trastorno simple del lenguaje, lo que supone una incidencia del 9,1% (2/22) de trastorno del lenguaje en acidosis. El caso N21, único superviviente afecto de EHI moderada-grave, tiene un desarrollo normal, lo que supone que en nuestro estudio un 50% de los niños con EHI moderada-grave tienen un buen pronóstico a los 2 años de vida, valorado en términos de mortalidad y neurodesarrollo. En el grupo de controles, son los N26 y N30 los que presentan un retraso global del desarrollo con puntuaciones compuestas de 60 y 70 para escala cognitiva respectivamente, de 47 para la escala del lenguaje ambos y de 70 y 97 para la escala motora, respectivamente, también en seguimiento en Neuropediatría y con el diagnóstico inicial de Trastorno del espectro autista (TEA), lo

que supone una incidencia del 9,5% (2/21) de alteración del neurodesarrollo en nuestro grupo de controles . (Tabla 36).

PACIENTES	CASOS n22	CONTROLES n21	P	TOTAL n43
Edad media	24,4±0,409 (24m 12d)	24,6±0,505 (24m 18d)		
ESCALA COGNITIVA				
Puntuación media	112,73±17,91	105±17,82	n.s	
≥85	22 (100%)	19 (90.5%)		41 (95,3%)
70-84	0	1 (4,8%)		1 (2,3%)
<70	0	1 (4,8%)		1 (2,3%)
ESCALA DEL LENGUAJE				
Puntuación media	108,68±18,42	107,38±24,23	n.s	
≥85	20 (90,9%)	19 (90,5%)		39 (90,7%)
70-84	2 (9,1%)	0		2 (4,6%)
<70	0	2 (9,5%)		2 (4,6%)
ESCALA MOTORA				
Puntuación media	111,36±13,73	109,24±14,27	n.s	
≥85	22 (100%)	20 (95,2%)		42 (97,7%)
70-84	0	1 (4,8%)		1 (2,3%)
<70	0	0		0

Tabla 36: Resultados de la escala de desarrollo infantil Bayley III.

V. DISCUSIÓN





En esta Tesis Doctoral se recogen los datos y estudios realizados sobre recién nacidos en situación de acidosis perinatal con $\text{pH} \leq 7,1$, en riesgo de resultados neurológicos adversos, y sobre recién nacidos sin ese riesgo considerados controles, valorados en el Servicio de Neonatología del Complejo Hospitalario Universitario de Santiago.

La asfixia perinatal continúa siendo a día de hoy una causa significativa de mortalidad y de complicaciones neurológicas en el RN. Se reconocen una serie de indicadores de riesgo que sugieren la posible existencia de un evento hipóxico-isquémico. Dentro de estos indicadores, uno de los más estudiados ha sido el **pH**. Durante la vida fetal, el pH se mantiene en un rango crítico gracias a diferentes sistemas buffer sanguíneos, como son principalmente la hemoglobina y el bicarbonato plasmático y en menor medida, el bicarbonato eritrocitario y los fosfatos inorgánicos. Se ha demostrado una fuerte asociación entre el pH bajo en sangre al nacimiento y los resultados adversos a corto y a largo plazo, en términos de morbi-mortalidad neonatal, incluyendo la parálisis cerebral. En sí mismo, la acidosis fetal debe usarse como medida de asfixia perinatal y como alerta para incrementar la vigilancia de estos niños, pero todavía no está muy claro que cifra de pH sería la más significativa¹⁵⁹. La acidemia neonatal basada en el análisis de la sangre arterial de cordón tradicionalmente ha sido definida como $\text{pH} < 7,20$. *Goldaber et al* sugieren una cifra de $7,00$ ¹⁶⁰ y el consenso existente para relacionar la parálisis cerebral con la hipoxia intraparto (*Cerebral Palsy Task Force*) pone el punto en $\text{pH} < 7,00$ y déficit de bases $> 12 \text{ mmol/l}$ ¹⁶¹. *Yeh et al* también coinciden en que el pH de mayor riesgo es el $\text{pH} < 7,00$, pero que el umbral para las secuelas neurológicas se sitúa en torno a $\text{pH} \leq 7,1$ y el riesgo más bajo entre $\text{pH} 7,26$ y $7,30$ ¹⁵⁸. Por lo tanto, entre las cifras de $\text{pH} 7,00$ y $7,20$ existe una zona muy amplia en la que la relación entre los resultados y el pH es menos clara, pero aceptamos que un $\text{pH} \leq 7,10$ podría incluir a un mayor número de pacientes dentro del umbral para las secuelas neurológicas, de ahí que sea el punto de corte elegido para nuestro estudio.

Por ello, el pH al nacimiento es un indicador de riesgo y tal y como expone el *Cerebral Palsy Task Force*, la acidosis metabólica es el criterio más importante que relaciona la asfixia fetal y la parálisis cerebral. En el estudio de *Boskabadi et al*¹⁶², ven que la severidad de la acidosis al nacimiento es uno de los principales factores de riesgo relacionados con alteraciones en el neurodesarrollo en los niños asfixiados, junto con la

necesidad de ventilación mecánica, la distocia de parto y las puntuaciones bajas en el test de Apgar y a su vez, no hallan relación entre la edad materna y la asfixia neonatal. En el estudio de *Futrakul et al*¹⁶³ observan que la puntuación de Apgar5, el sexo masculino, el prolapso de cordón umbilical, la postmadurez y el parto instrumentalizado son factores de riesgo para EHI. Nosotros hemos objetivado que las principales variables relacionadas con el pH de riesgo para secuelas neurológicas son el Apgar1 y 5, la necesidad de reanimación al nacimiento y las cifras de lactato. Por el contrario, no hemos encontrado relación entre el tipo de parto y los valores de pH, pero sí entre el tipo de parto y las puntuaciones Apgar y las concentraciones de lactato, presentando los neonatos nacidos por PI las concentraciones más altas de lactato y las peores puntuaciones Apgar. No hemos encontrado diferencias en cuanto a la edad materna entre el grupo de casos y controles ni tampoco que la edad gestacional se correlacione con el pH ni con el Apgar ni con las cifras de lactato al nacimiento. En nuestro estudio, el sexo masculino también se comporta como un marcador de riesgo, ya que hallamos una correlación entre las cifras de pH y lactato y el sexo masculino, de forma que los varones tienen pH más acidóticos y cifras mayores de lactato que las mujeres. De hecho, de los 2 casos que tenemos afectados de EHI moderada-grave, ambos son varones y en concreto el N8, que fallece a las pocas horas de vida, es el que presenta la mayor acidosis de todos los casos (pH 6,60). Esto también coincide con lo publicado por *Bekedam et al* en el año 2002¹⁶⁴ y por *Ahmadpour-Kacho et al* en el año 2015¹⁶⁵, quienes objetivaron una mayor incidencia de acidemia perinatal en los varones. *Mohamed et al*¹⁶⁶ van más allá, y muestran una relación significativa entre el sexo masculino y la asfixia neonatal e incluso *Hussein et al*¹⁶⁷ afirman que, ya de por sí, el sexo masculino tiene una mayor vulnerabilidad al daño en comparación con el sexo femenino, pues encuentran mayores niveles de antioxidantes en LCR en las niñas y de hecho, en el estudio de *Boskabadi*, vieron también que en los RN asfixiados que tuvieron una mala evolución a largo plazo existía un mayor porcentaje de varones¹⁶².

Por todo ello, el análisis del pH en sangre de cordón se aconseja en todos los partos de riesgo y en algunos centros, como en el nuestro, se hace de forma rutinaria tras todos los partos¹⁶⁸.

Además del pH, existen otros indicadores de riesgo que debemos reconocer. Paralelamente al descenso del pH se produce un incremento en el **déficit de bases**, así

pues el EB es un valor calculado en función del pH y el dióxido de carbono^{169,170}. En 1997, *Dr. Low et al*¹⁷¹ publicaron un estudio de casos y controles en el que concluían que un déficit de bases ≥ 12 mmol/L suponía un incremento del riesgo de complicaciones neonatales moderadas a graves. En nuestro grupo de casos, el EB medio fue de -14,02 mmol/L y 13 de los 23 casos presentaron un déficit de bases superior a 12 mmol/L. En el grupo control, el EB medio fue de -3,89 mmol/L y ningún paciente tuvo un déficit de bases superior a dicha cifra. Dado que el pH y el EB están íntimamente relacionados, son 2 mediciones dependientes, en sí mismo el EB no proporcionaría un valor adicional al pH¹⁷².

Ahora bien, a diferencia del EB, en las situaciones de hipoxia-isquemia como resultado del metabolismo anaerobio se produce directamente **ácido láctico**, por lo que los valores de láctico también son marcadores de riesgo de resultados neurológicos adversos. En nuestro estudio hemos objetivado que los casos presentan una cifra media de láctico superior a más del doble la cifra de los controles, que existe una correlación negativa entre el pH y las concentraciones de lactato y que al igual que para el pH, el lactato también se correlaciona significativamente con otros marcadores de gravedad, de forma que los pacientes con mayor necesidad de reanimación al nacimiento tienen concentraciones superiores de lactato y los pacientes con menores puntuaciones Apgar tienen concentraciones más altas de lactato. Incluso, en el estudio de *Shah et al*¹⁷⁴ se demostró que el lactato $>7,5$ mmol/L en la primera hora de vida se asociaba con EHI moderada a severa con una sensibilidad del 94% y una especificidad del 67%. En nuestro grupo de casos, 18 pacientes tienen cifras de lactato al nacimiento superiores a 7,5 mmol/L y en los 5 casos que presentaron clínica de EHI, el lactato fue superior a dicha concentración. Se ha discutido si el lactato pudiera tener un valor superior al pH en identificar a los pacientes en riesgo de resultados adversos y de hecho, *Tuuli et al*¹⁷⁴ hallaron que concentraciones de lactato en sangre arterial umbilical $>3,9$ mmol/L fueron más sensibles y específicas para morbilidad neonatal que el pH bajo y el EB elevado. También se ha barajado la determinación de láctico como alternativa a la determinación del pH en unidades de primer nivel, pues pudiera resultar más barato que hacer una gasometría completa¹⁷⁵. Pero por el momento, la relación entre el lactato en sangre y las secuelas neonatales no está tan validada en la literatura y el pH sigue manteniéndose como el marcador de riesgo fundamental.

El **test de Apgar** permite obtener una primera valoración simple y clínica sobre el estado general inmediato del RN. Como se ha visto en otros estudios^{176,177}, nosotros también hemos encontrado una correlación positiva entre el pH y el score de Apgar tanto al minuto como a los 5 minutos de vida, de forma que los pacientes con puntuaciones más bajas presentan pH más bajos al nacimiento. Ahora bien, hay que tener presente que este test tiene limitaciones a la hora de identificar la asfixia perinatal, así pues, pueden existir puntuaciones bajas y que no se deban a una situación de asfixia, por ejemplo cuando existen anomalías congénitas, en niños prematuros y en las situaciones de sedación materna¹⁷⁸. El valor a los 5 minutos es un mejor predictor de la supervivencia del niño y puntuaciones entre 0 y 3 dan información sobre el alto riesgo de mortalidad neonatal temprana^{179,180}. Así es que, además de con el pH y el lactato, nosotros hemos objetivado una relación entre el Apgar5 y otro marcador de gravedad, como es la necesidad de reanimación al nacimiento (mayor necesidad de RCP a menor puntuación Apgar5) y en nuestro grupo de casos, N8 y N21 obtuvieron una puntuación Apgar5 entre 0 y 3, ambos afectados de EHI moderada-grave y concretamente el caso N21 obtuvo una puntuación de 3 y el N8 de 0 y falleció a las pocas horas de vida. Por ello, nosotros seguimos considerando que el Apgar5 es un predictor de mortalidad neonatal precoz, pero que presenta limitaciones en la predicción de resultados neurológicos adversos a largo plazo, probablemente relacionado con que no es un método objetivo y de hecho, en diferentes estudios se ha demostrado que varios de los pacientes con parálisis cerebral tenían un Apgar normal al nacimiento¹⁸¹. Por otro lado, se ha demostrado que el Apgar a los 10 minutos tiene una mayor utilidad en el control y seguimiento de las medidas de RCP, de forma que con un Apgar 0 a los 10 minutos de vida, es decir, en un paciente sin actividad cardíaca u otro signo de vida, estaría justificado detener las maniobras de reanimación y no está todavía claro el significado clínico de un Apgar 0-1 a los 10 minutos de vida, sobre todo en pacientes sometidos a tratamientos neuroprotectores como la hipotermia, se precisan más estudios en este sentido¹⁸², de ahí que en nuestro estudio no nos hayamos centrado en analizar su valor.

Desde un punto de vista práctico, lo que se pretende es dar a conocer la importancia que estos factores de riesgo y el adecuado manejo perinatal tienen en los resultados neurológicos neonatales. En este sentido, con frecuencia el daño se inicia ya antenatalmente y el reconocimiento de las alteraciones antenatales con una adecuada

monitorización fetal juega un papel fundamental. El registro cardiotocográfico es comúnmente usado para monitorizar el bienestar fetal durante el trabajo de parto. El objetivo de esta monitorización es mejorar los resultados perinatales y evitar las intervenciones innecesarias. Se usa como un arma para predecir la hipoxia fetal basada en el reconocimiento de diferentes patrones de frecuencia cardiaca fetal, los cuales pueden ser clasificados en normales, sospechosos o patológicos, así es que un patrón cardiotocográfico anormal podría representar la respuesta fetal a la reducción del aporte de oxígeno. La utilidad de esta monitorización queda bien refleja en nuestro estudio, en donde al analizar retrospectivamente la presencia de alteraciones cardiotocográficas fetales vemos que éstas fueron detectadas en 9 de los pacientes acidóticos (N2, N4, N8, N12, N13, N14, N16, N20, N22). No obstante, existe una considerable variación individual en la habilidad del feto para adaptarse a la reducción en la oxigenación, y esta variación puede verse representada por cambios en el registro cardiotocográfico, de hecho la monitorización cardiotocográfica tiene un elevado valor predictivo negativo (VPN) para predecir acidemia fetal y resultados adversos perinatales y un bajo VPP. Incluso algunos autores han referido que solamente un 50-60% de los fetos que presentan patrones cardiotocográficos alterados tipo taquicardia fetal, variabilidad reducida y desaceleraciones están acidóticos¹⁸³. Por ello, ante un patrón patológico o sospechoso, se emplean conjuntamente otros métodos de monitorización del bienestar fetal, como es la medición del pH a nivel del cuero cabelludo¹⁸⁴, a nivel capilar, y la valoración de las características del líquido amniótico y así conjuntamente, se aumenta el VPP en la detección de acidosis fetal.

En nuestro estudio, en 8 casos se refería otra forma de SPBF como es la presencia de líquido meconial (N1, N3, N6, N8, N10, N19, N23) y acidosis en pH de cuero cabelludo (N4), en 2 (N15, N16) la existencia de eventos hipóxicos centinela (sangrado materno y circular de cordón) y en 1 (N21) distocia de parto. Esto junto con la detección de las alteraciones cardiotocográficas fetales supone que en nuestro grupo de casos en hasta un 73,9% de las situaciones podríamos haber sospechado antenatalmente la posibilidad de complicaciones neonatales y si tenemos en cuenta que en 4 de los controles también se refería SPBF por la presencia de líquido meconial, la monitorización conjunta en nuestro estudio tuvo un VPP del 80,9% (de los 21 niños que manifestaron alguna forma de alteración en la monitorización, 17 tuvieron acidosis al nacimiento) y un VPN del

92% (de los 25 niños en los que no se refería ninguna alteración en la monitorización, 23 no tuvieron acidosis al nacimiento). Hay que tener presente que el valor del pH en el cuero cabelludo suele ser mayor que la cifra a nivel arterial, por ello tal y como indican las guías nacionales, se mantiene la indicación de finalización del parto si en el cuero cabelludo obtenemos un $\text{pH} < 7,20$, aunque los datos sobre la relación entre el pH en el cuero cabelludo y los resultados neurológicos son limitados y se considera normal un pH en cuero cabelludo $> 7,25$ y entre 7,20 y 7,25 se define como “preacidosis”¹⁸⁵. Para la determinación del pH en cuero cabelludo se requiere un volumen relativamente alto de sangre y con frecuencia las muestras no son válidas. De hecho, distintos autores defienden la mayor utilidad de la determinación del lactato en el cuero cabelludo, dado que se precisa un menor volumen de sangre (suele ser suficiente con 5 μL) y a que tiene una seguridad similar a la del pH en predecir acidemia fetal¹⁸⁶. Un lactato en cuero cabelludo de 4,8 mmol/L representa un p75 y equivale a un pH en cuero cabelludo aproximadamente de 7,20¹⁸⁷. Ahora bien, como en el caso de la monitorización cardiotocográfica, tanto el pH como el lactato medidos en el cuero cabelludo tienen un alto VPN y un bajo VPP en predecir la acidemia, la EHI y los scores de Apgar bajos y de hecho se ha visto que menos de 1% de los niños en los que se decidió la finalización inmediata de la gestación por un lactato $> 4,8$ mmol/L tuvieron un $\text{pH} < 7,00$ al nacimiento¹⁸⁸, recalándose nuevamente la importancia de la monitorización conjunta en la toma de decisiones y manejo perinatal.

Como bien indica su nombre, estos factores descritos son indicadores de riesgo, con especial valor para el pH en sangre de cordón, que nos deben poner en alerta ante la posibilidad de que el paciente pueda sufrir hipoxia-isquemia y secundariamente daño neurológico. Sin embargo, no todos los neonatos con gases arteriales alterados tendrán resultados desfavorables y de hecho, la mayoría de los RN a término con pH bajo, déficit de bases y láctico elevados al nacimiento tendrán un desarrollo normal¹⁵⁸. Así es que, el tener un pH bajo en sangre de cordón ante un RN vigoroso y sin compromiso cardiopulmonar no es un indicador inexorable de resultados adversos y así puede verse en nuestro grupo de casos, de los cuales 5, todos ellos con Apgar1 ≥ 8 y Apgar5 de 10 puntos y sin necesidad de reanimación al nacimiento, no precisaron ingreso en el Servicio de Neonatología y tuvieron una buena evolución clínica. Por otro lado, un pH normal al nacimiento en un niño que nace deprimido nos debe alertar sobre otras

posibles causas de depresión perinatal como sepsis, trauma o anomalías congénitas¹⁸⁹.

Dentro de los resultados adversos relacionados con la acidosis perinatal cabe destacar las alteraciones neurológicas y la **mortalidad**. En el metaanálisis realizado por *Malin et al*, puede verse como en diferentes estudios se ha relacionado la acidosis en sangre de cordón con la mortalidad y en todos ellos, la odds ratio es superior a 1.0 y con una relación más fuerte para el pH <7,00; también refieren relación entre el pH y los resultados neurológicos adversos como la presencia de EHI, convulsiones, hemorragia intraventricular o leucomalacia periventricular y la parálisis cerebral, refiriéndose odds ratio de 13.8, 8.1, 2.9 y 2.3, respectivamente¹⁵⁹. En el estudio de *Boo et al*¹⁹⁰ se refiere una mortalidad del 15,7% en EHI y en el de *Chalak et al*¹⁹¹ del 11%. Nosotros tenemos una incidencia del 4,3% de mortalidad en acidosis y del 20% en EHI. A su vez, la incidencia de **EHI** en acidosis es variable según los diferentes estudios publicados. *Ahmadpour-Kacho et al*¹⁶⁵ objetivan una incidencia del 28,3%, similar a la referida por *Chalak et al*¹⁹¹ quienes describen una incidencia del 27% de EHI moderada a grave en acidosis. Nosotros objetivamos una incidencia inferior, concretamente un 21,7% de nuestros niños con pH ≤7,1 presentan EHI y un 8,7% tienen una forma moderada-grave. Estas diferencias en la incidencia de EHI en acidosis podrían explicarse, entre otros factores, por la variabilidad en el punto de corte elegido para definir la acidosis en los distintos estudios y por la calidad de los cuidados neonatales proporcionados.

En la **valoración integral del desarrollo neurológico** se ha estandarizado el uso de test con normas y criterios referenciados. La escala Bayley III (2006) supone una mejora cualitativa importante respecto a sus antecesoras, Bayley I (1969) y Bayley II (1993), ya que conlleva una actualización de los baremos y un perfeccionamiento de la fiabilidad y validez de la prueba. La información normativa de la Bayley III se basa en una muestra de estandarización nacional representativa de la población de EEUU de niños de 1 a 42 meses. Un plan de muestreo estratificado aseguró que la muestra de estandarización incluyese proporciones representativas de los niños de acuerdo con variables demográficas seleccionadas. La muestra de estandarización incluyó 1700 niños divididos en 17 grupos de edad, desde 1 mes a 42 meses. Cada grupo de edad se compuso por 100 participantes. Los niños con una variedad de posibles condiciones confusas se excluyeron de la participación. Se sumó a la muestra normativa una proporción representativa de los niños de grupos especiales (aproximadamente un 10%

del total de la muestra, incluyendo niños con Síndrome de Down, parálisis cerebral, trastorno generalizado del desarrollo, prematuridad, trastorno del lenguaje y con factores de riesgo en el desarrollo) para representar de una manera más precisa la población de niños. La prueba de validez convergente y discriminante de esta escala, se obtuvo a través de estudios de correlación entre la Bayley III y los siguientes test: *Bayley II*, *Wechsler Preschool and Primary Scale of Intelligence III* (Wechsler 2002), *Preschool Language Scales, Fourth Edition* (Zimmerman, Steiner y Pond, 2003) y la *Escala de Evaluación de la Conducta adaptativa, segunda edición* (Harrison y Oakland, 2003). En su “Manual técnico” se refiere una media total de los coeficientes de fiabilidad de los subtests, que oscila entre 0,86 (Motricidad fina) hasta 0,91 (Cognitiva, Comunicación expresiva, y Motricidad gruesa). El coeficiente de fiabilidad restante de la Escala de Comunicación receptiva es de 0,87. Los coeficientes de fiabilidad para las escalas compuestas son de 0,93 para la compuesta del lenguaje y de 0,92 para la compuesta Motriz. La adaptación española de la Bayley III (Bayley, 2015) ha sido realizada por el *Departamento I+D de Pearson Clinical and Talent Assessment en colaboración con el CDIAP Pacr Taulí del Servicio de Medicina Pediátrica de la Corporació Sanitària Parc Taulí y el Grupo de Investigación en Atención Temprana (GIAT) de la Universidad de Murcia*. Las correlaciones entre la Bayley III y otros instrumentos españoles y estadounidenses con las mismas características, apoyan la utilización de los baremos americanos en la población de niños españoles. Se proporcionan también pruebas que constatan que la Bayley III es sensible a las diferencias de rendimiento de los niños, y permite detectar a niños con riesgo de retraso en el desarrollo. Además, la mayoría de los resultados de los estudios de grupos especiales son consistentes con las expectativas basadas en investigaciones previas con grupos especiales estadounidenses.

Actualmente la Bayley III es un instrumento ampliamente utilizado. Numerosos artículos hacen referencia a su utilidad en diferentes ámbitos^{78,192-197}, y dada su gran validez y seguridad en la valoración del rendimiento de los niños durante los primeros meses de vida, es la escala que nosotros hemos elegido para la valoración de nuestros niños. Como se ha referido anteriormente, la mayoría de los estudios realizados en niños con EHI sometidos a hipotermia encuentran una reducción significativa de la mortalidad y discapacidad en los niños a los 18-24 meses de vida, de ahí que nosotros hayamos

elegido los 24 meses para la realización de la Bayley III.

En cuanto a nuestros resultados en la **evolución a largo plazo**, a los 24 meses de vida no hallamos diferencias en las puntuaciones medias en cada uno de los tres dominios evaluados por la escala de desarrollo Infantil Bayley III entre el grupo de casos con respecto al grupo control ni en los datos somatométricos, incluido el PC.

Dentro del grupo de casos, 2 niños, N5 y N6 no afectados de EHI al nacimiento, presentan una alteración aislada y moderada del lenguaje, concretamente tienen **un trastorno primario del lenguaje**, es decir, un trastorno específico del lenguaje que no se acompaña de otras alteraciones como discapacidad intelectual, retraso global del desarrollo, alteración auditiva, disfunción motora u otra alteración mental o médica en general. Ello supone una incidencia del 9,1% (2/22) de trastorno del lenguaje en acidosis, incidencia superior a la de la población general en donde en menores de 7 años se refiere una prevalencia media de trastorno/ retraso del lenguaje receptivo del 2,5-3,5%, del lenguaje expresivo del 2,8-16% y del 2-3% para la afectación conjunta de ambos componentes, e incluso para algunas series la prevalencia de trastorno específico del lenguaje es del 7-8% en niños menores de 5 años^{198,199}.

Además de las patologías neurológicas, son numerosos los factores relacionados con los retrasos/ trastornos del lenguaje como la inadecuada estimulación ambiental, el particular e individual ritmo de desarrollo de cada individuo, condiciones emocionales, maduración social y factores hereditarios. En los casos de trastorno primario del lenguaje, las causas son difíciles de determinar y han sido propuestos numerosos factores, incluyendo déficits en los procesos cognitivos^{200,201}, diferencias puramente biológicas²⁰² y variaciones genéticas^{203,204}.

El caso N21, el único superviviente afectado de EHI moderada-grave, tiene un desarrollo normal, lo que supone que en nuestro grupo de casos el 50% de los niños con EHI moderada-grave tienen un buen pronóstico a los 2 años medido en términos de mortalidad y neurodesarrollo. En este niño, si retrospectivamente analizamos los factores implicados en el pronóstico, vemos que al alta hospitalaria la aproximación pronóstica era difícil pues tenía datos de buen y mal pronóstico: como dato negativo desde un punto de vista clínico, estaba la gravedad de la EHI y como positivo, la accesibilidad al tratamiento con hipotermia junto con la exploración neurológica normal

y sin datos de alerta al alta, salvo la afectación localizada con parálisis braquial y síndrome de Horner¹²⁰; a nivel neurofisiológico, como dato negativo destacaba la presencia de un EEGa continuo de bajo voltaje en las primeras 72 horas y como positivo, la ausencia de crisis comiciales y la aparición precoz de los ciclos de sueño-vigilia en las primeras 24 horas junto con los EEG posteriores, los PEV y PEATC normales^{119,126}; a nivel de la neuroimagen, como dato negativo tenía la afectación difusa de la SB frontal, occipital y de los hemisferios cerebelosos en la RM realizada en la primera semana de vida¹³⁹, aunque con un control previo al alta mostrando lesiones residuales de edema; al analizar los biocarmadores de daño neurológico, tenía concentraciones de ENE en sangre (86,5 µg/L) superiores a las referidas por *Celtik et al* con significación pronóstica (45,4 µg/L)¹⁴¹, de S100 sérica (1,3 µg/L) inferiores al punto de corte con valor pronóstico referido por *Qian et al* (2,20 µg/L)¹⁴² y de S100 en orina (11,68 µg/L) superiores a las referidas con valor pronóstico por *Gazzolo et al*¹⁴³ y por *Risso et al*¹⁴⁴ (0,41 µg/L y 1 µg/L, respectivamente).

En el grupo control, 2 niños, N26 y N30, presentan un **trastorno global del desarrollo** con puntuaciones alteradas en las escalas cognitiva, del lenguaje y motora, lo que supone un 9,5% (2/21) de alteración en el neurodesarrollo en el grupo control.

La menor incidencia de alteraciones neurológicas en nuestro grupo de casos, se podría explicar en parte por el bajo número de pacientes con EHI moderada-grave que hemos tenido en el grupo de casos y con elevada mortalidad, y de hecho, si valoramos en conjunto resultados adversos en términos de mortalidad y alteración del neurodesarrollo, nuestra incidencia en el grupo de casos (13%) es superior a la del grupo control (9,5%) y también, por nuestra incidencia menor de EHI en acidosis con respecto a otros estudios, que pudiera estar a su vez influenciado por la calidad de los cuidados neonatales inmediatos proporcionados y también por el punto de corte elegido para definir el pH de riesgo. Estos hallazgos son similares a los publicados en otros estudios, en los que se objetiva que en las situaciones de acidosis perinatal, el riesgo de mortalidad y secuelas neurológicas se presenta fundamentalmente para los niños que al nacimiento presentan cuadros encefalopáticos. Así es que, en el estudio *Hafström et al*²⁰⁵ ven que los niños a término con acidosis metabólica severa en sangre de cordón que aparentan sanos al nacer no tienen incrementado el riesgo de resultados neurológicos adversos o del comportamiento a los 6,5 años; *Dennis et al*²⁰⁶ tampoco

encuentran relación entre la acidosis y el neurodesarrollo, valorando a los niños a los 4,5 años; *Svirko et al*²⁰⁷ valoran aspectos cognitivos en niños a los 6-8 años y ven que niños con pH bajos arteriales tienen puntuaciones altas en estos test y *Wildschut et al*²⁰⁸ no encuentran relación entre la acidosis al nacimiento y el desarrollo motor, cognitivo y comportamental a los 4 años. Ahora bien, nosotros sí objetivamos una incidencia mayor de trastornos del lenguaje en nuestro grupo de casos con respecto a la de la población pediátrica general y en niños sin EHI al nacimiento, por lo que aunque existen otros factores relacionados con estos trastornos, es probable que la acidosis haya tenido su papel.

Por lo tanto, de forma general, concluimos que aunque la acidosis es un factor de riesgo mayor para EHI y mortalidad precoz, no se puede asegurar un resultado adverso solamente por la valoración aislada del pH. De hecho, como ya se ha comentado anteriormente, el pronóstico de los pacientes está íntimamente relacionado con la gravedad de la encefalopatía y su persistencia e incluso como ha demostrado *Chalak et al*¹⁹⁷, y como hemos comprobado en nuestro estudio, aún en formas moderadas-graves hasta un 50% de los pacientes pueden tener un desarrollo neurológico normal (en su estudio, en los pacientes con formas de EHI moderada-grave la incidencia de mortalidad es del 11% y de los supervivientes, el 50% tienen un desarrollo neurológico normal a los 24 meses evaluado con la escala Bayley III en sus tres dominios, un 37% presentan un retraso moderado y un 13% severo). En este sentido, nuestro estudio presenta limitaciones relacionadas con el tamaño muestral, pues solamente 2 pacientes presentaron EHI moderada-grave, de los cuales uno falleció y por lo tanto, solamente a un paciente con EHI moderada-grave se le ha hecho el seguimiento a los 24 meses de vida y relacionadas con el tiempo de seguimiento, que por el momento se ha hecho hasta los 24 meses de vida, siendo probable que formas leves de EHI puedan presentar algún trastorno del desarrollo más a largo plazo. Además de los propios factores biológicos, existen numerosos factores ambientales que pueden condicionar el desarrollo neurológico a largo plazo y que nosotros no hemos evaluado en nuestro grupo de niños, dentro de los cuales se ha demostrado que el nivel educativo de los padres, sobre todo del materno²⁰⁹, el nivel socioeconómico y el ambiente en el hogar²¹⁰ tienen un gran impacto en el neurodesarrollo de los hijos, sobre todo durante los primeros años de vida, que es cuando se produce una intensa maduración biológica y

cambios comportamentales, especialmente en el desarrollo motor que es a su vez un factor crítico en el comportamiento de los niños y de hecho, numerosos estudios encuentran que la habilidad motora está asociada con la habilidad cognitiva²¹¹⁻²¹³. Los principales estudios diseñados para evaluar las características generales del hogar y la relación con el comportamiento posterior, refieren que uno de los hallazgos más llamativos es que la “disponibilidad de material de juegos estimulantes” es un predictor del comportamiento mental futuro²¹⁴.

En el estudio de *Hafström et al*²⁰⁵, también objetivan que los controles (niños sin acidosis ni EHI al nacimiento) pueden presentar resultados adversos en forma de muerte o alteraciones en el neurodesarrollo, concretamente refieren Síndrome de Ehler-Danlos, de Asperger, Síndrome por déficit de atención e hiperactividad y retraso global leve del desarrollo, pero con una incidencia del 3,3%, inferior a la objetivada en nuestro grupo de controles (9,5%). Además, teniendo en cuenta nuestro grupo total de niños a los que se le realizó seguimiento, tenemos una incidencia de TEA del 4,6% (2/43), muy superior al 1,5% (1 cada 68 niños de 8 años de edad) referido por el *Centro para el Control y Prevención de Enfermedades* (CDC)²¹⁵. Este trastorno se define por el déficit persistente en la comunicación e interacción social, así como por comportamientos, actividades e intereses repetitivos y restrictivos²¹⁶. Se asume que tiene una etiopatogenia multifactorial, resultado de una interacción compleja entre factores genéticos y ambientales.

Aunque no podemos justificar la mayor incidencia de TEA en nuestro grupo de niños, los estudios epidemiológicos de las últimas décadas han mostrado un dramático incremento en su prevalencia, alcanzando incidencias de hasta el 2%, cobrando mucho valor la influencia que los factores ambientales pueden ejercer en esta patología²¹⁵ y que es probable que estén teniendo un gran peso en nuestro grupo de niños de estudio. Los principales factores ambientales implicados²¹⁷ hasta la fecha han sido la exposición a contaminantes aéreos²¹⁸⁻²²⁰ y pesticidas^{221,222}. En menor medida, en otros estudios también se ha relacionado el TEA con la depresión materna durante la gestación, con los cambios alimentarios con dietas deficientes en ácidos grasos omega-3 durante la primera infancia²²³ y con complicaciones neonatales como la anoxia perinatal²²⁴. En los estudios en los que se analiza la relación entre la acidosis perinatal y el TEA se ve que existe una relación menor y de hecho, como se expone en el metaanálisis de

*Modabbernia et al*²²⁵, existe un pequeño incremento de riesgo de autismo en los recién nacidos con acidosis con una odds ratio del 1.10. En conclusión, el TEA es un trastorno de causa multifactorial donde otros factores diferentes a la acidosis perinatal tienen un mayor peso en su etiología, lo que podría explicar su mayor incidencia en nuestro grupo control con respecto al grupo de casos y la mayor incidencia en nuestro grupo global de estudio, en donde no hemos evaluado la influencia de otros factores ambientales.

Profundizando en la **fisiopatología de la hipoxia-isquemia**, es bien conocido el papel que los aminoácidos excitatorios, especialmente el glutamato, tienen en la génesis de la lesión cerebral. En condiciones fisiológicas, estos aminoácidos tienen una función crucial en los procesos de neurodesarrollo, lo que explica que las concentraciones de glutamato en LCR y plasma sean máximas en el feto y en el RN, descendiendo rápidamente durante los primeros meses de vida y lentamente durante los siguientes años^{226,227}. Como ya se ha mencionado previamente, en condiciones normales, existe una difusión unidireccional de glutamato desde el SNC a la sangre mediado por los capilares de las células endoteliales a nivel de la barrera hematoencefálica. Por ello, los incrementos de glutamato cerebral se siguen por incrementos del glutamato en sangre²²⁸, lo que contribuye al mantenimiento de un equilibrio preciso en las concentraciones de glutamato cerebrales y a la neuroprotección, que ya se inicia en la vida fetal al permitirse la eliminación del glutamato a través de transportadores localizados en la placenta que por transporte activo son capaces de remover el exceso de glutamato desde la sangre fetal a la materna. De hecho, la placenta es responsable del metabolismo fetal del glutamato en más de un 80%^{229,230}.

En diversos estudios^{231,232}, tanto en modelos animales como humanos, se ha demostrado que en condiciones de hipoxia-isquemia se produce una alteración en la homeostasis del glutamato cerebral que da lugar a un incremento rápido y precoz de sus concentraciones en el LCR (en la asfixia perinatal, se libera al LCR inmediatamente tras el nacimiento, alcanzando un pico precozmente y disminuyendo a las 72 horas²³³) y secundariamente a nivel sérico, facilitado por la alteración de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica que origina la propia hipoxia-isquemia y aún más en el RN, que ya de por sí tiene una barrera más permeable que la del adulto. Además, también se ha demostrado que dichas elevaciones se correlacionan con la intensidad de la hipoxia-isquemia (los niños con mayores grados de EHI tienen concentraciones superiores de

aminoácidos excitatorios)²³³ y que aún en situaciones de cortos periodos de hipoxia, sin llegar a producir daño tisular, las concentraciones de glutamato están incrementadas²³⁴. *Nombela et al* realizaron un estudio en pacientes adultos sometidos a hipoxia cerebral temporal y sin daño isquémico al producir cortos periodos de oclusión de la arteria carótida interna, y objetivaron que las concentraciones de glutamato se incrementaban en sangre, de forma que las alteraciones de la homeostasis del glutamato cerebral empezaban inmediatamente después de un corto periodo de hipoxia incluso sin que existiese evidencia de daño tisular²³⁴. Estos hallazgos son congruentes con los obtenidos en nuestro estudio, en donde los niños del grupo acidótico de riesgo, aún sin evidencia finalmente de daño neurológico, tienen concentraciones superiores de glutamato que los niños del grupo control y además, dichas concentraciones se correlacionan con la severidad de la acidosis (a menor pH mayores son las concentraciones de glutamato) y con otros indicadores de gravedad como son el lactato y las puntuaciones Apgar.

En cuanto al papel que el sexo puede tener en las situaciones de hipoxia-isquemia, ya hemos comentado previamente que los varones son más susceptibles que las mujeres y que un evento de la misma magnitud provoca consecuencias más graves en el varón^{235,236}. Sin embargo, tal y como objetivamos en nuestro estudio, las concentraciones de glutamato no se correlacionan con el sexo de los niños, por lo que la susceptibilidad de los varones a la hipoxia-isquemia no podría justificarse por concentraciones superiores de glutamato con respecto a las mujeres, lo que coincide con lo publicado por otros autores quienes tampoco encuentran diferencias en las concentraciones de glutamato según el sexo de los RN, lo que se atribuye a la escasa influencia que ejercen las hormonas sexuales en este periodo de la vida dada la inmadurez gonadal^{226,229}, a diferencia de lo que ocurre en los adultos en los que las cifras de glutamato son menores en el sexo femenino y guardan una relación inversa con los niveles de hormonas (estrógenos y progesterona) pudiendo tener una función neuroprotectora en el sexo femenino²³⁷. Esto también podría explicar que no hayamos objetivado diferencias en las concentraciones de las enzimas hepáticas y de la CK según el sexo de los niños.

En base a los conocimientos sobre el ciclo del glutamato y las limitaciones existentes en la terapéutica de la EHI, se han intentado desarrollar diversos **tratamientos** que actuando a distintos niveles puedan mejorar el pronóstico de estos pacientes.

Una de las dianas más intensamente estudiadas son los **receptores del glutamato**. La literatura está repleta de ejemplos de antagonistas ionotrópicos competitivos y no competitivos, pero no se ha demostrado hasta la fecha ningún tratamiento eficaz en bloquear el glutamato a nivel postsináptico, incluso con el uso de fármacos bloqueadores de los receptores NMDA como son *Dizocilpina*, *Ketamina*, *Aptigabel* o *Aptiganel* se han descrito efectos potencialmente dañinos²³⁸⁻²⁴⁷. En modelos animales, con *Selfotel* (antagonista competitivo del receptor NMDA) se ha mostrado un gran potencial en atenuar la muerte neural en el ACV isquémico, y con *Dizocilpina* y *Dextrometorfano* (antagonistas no competitivos del receptor NMDA) en disminuir el volumen lesional. Sin embargo, en los ensayos clínicos en humanos no se han visto diferencias entre los pacientes tratados y los que recibieron placebo. El receptor NMDA requiere para su activación la unión simultánea de glutamato y los co-agonistas D-serina y glicina. Se sabe que existe una regulación estrecha entre los niveles de estos co-agonistas y la activación de los receptores NMDA en el cerebro en desarrollo y que las alteraciones en sus concentraciones y en la activación de los receptores, como tiene lugar durante los procesos hipóxico-isquémicos, son particularmente deletéreas. En este sentido, también se han intentado crear fármacos que actúen a este nivel²⁴⁸. Lo mismo ocurre con los antagonistas del receptor AMPA como por ejemplo, el fármaco *YM-872*, con el que todavía no se han visto resultados positivos en los ensayos clínicos con humanos. También se han estudiado los receptores metabotrópicos del glutamato. Estos receptores indirectamente modulan la neurotransmisión excitatoria por proteínas acopladas a proteínas G que a su vez afectan a la actividad enzimática y a la conductancia del canal iónico. Se dividen en 3 grupos: El grupo 1 que incrementa la actividad del receptor NMDA, y los grupos 2 y 3 que la disminuyen. En modelos en ratas con infarto cerebral, un antagonista iv del grupo 1 (*YM-202074*) se ha visto que disminuye el volumen de lesión, pero tampoco por el momento se ha demostrado su utilidad en los ensayos clínicos con humanos²⁴⁹.

Otros esfuerzos se han centrado en actuar sobre el **disbalance iónico** mediado por los receptores del glutamato. Varios ensayos clínicos con calcio antagonistas como son *isradipina*, *nimodipino* y *flunarizina* no han dado resultados. Incluso, en algunos casos como con *flunarizina* se han visto resultados adversos²⁵⁰. Los resultados clínicos con bloqueadores de los canales de sodio y potasio tampoco han tenido mejores resultados,

así por ejemplo con el uso de *sipatrigina* (antagonista del canal del sodio) se ha descrito disminución del nivel de conciencia, agitación, confusión y alucinaciones²⁵¹.

Otras líneas de investigación han girado en aumentar el **aclaramiento de glutamato** de la hendidura sináptica por medio de los EAATs. En 2008 *Thöne-Reineke et al* describieron que la administración intraperitoneal de *ceftriaxona* incrementaba la actividad del transportador EAAT2²⁵². En cultivos celulares, una molécula inductora de EAAT2 como es *Piridazina derivativa LDN/OSU-0212320* se ha visto que protege a las neuronas frente la excitotoxicidad inducida por el glutamato²⁵³. Pero todavía no se ha probado la eficacia de estos fármacos en ensayos clínicos en humanos.

Otros puntos de investigación están focalizados en actuaciones sobre el ciclo del glutamato **a nivel periférico** (fuera del SNC), basados en la idea de que al disminuir el glutamato en la sangre, se genera un gradiente de concentración entre la sangre y el tejido cerebral, favoreciéndose la eliminación del glutamato del LCR. Además, con el uso de tratamientos con actuación periférica, se evitarían los problemas derivados de la pobre permeabilidad de la barrera hematoencefálica y los efectos neurotóxicos potenciales de los fármacos con actuación central directa. Se ha valorado incluso la posibilidad de actuar ya en la vida fetal, iniciando el tratamiento intraútero, al generar un gradiente de concentración entre la sangre fetal y la materna al disminuir el glutamato materno y así, a través de los EAATs placentarios favorecer el paso de glutamato desde el feto hacia su madre. A nivel periférico existen las enzimas limpiadores de glutamato, GOT y GPT, que en situaciones de privación de glucosa, favorecen la eliminación del glutamato sérico y secundariamente del cerebral ejerciéndose una acción neuroprotectora²⁵⁴. En diferentes estudios, se ha demostrado que la GPT tiene un papel menor con respecto a la GOT como enzima limpiadora de glutamato^{229,255}.

*Boyko et al*²⁵⁶ analizaron en distintos grupos de ratas la capacidad de disminución de las concentraciones de glutamato tras la administración de salino (grupo control), GPT o GOT. Encontraron que con todos los tratamientos, excepto con la administración de salino, se indujo una disminución de las concentraciones de glutamato en sangre, siendo más eficiente la GOT que la GPT. Nosotros también vemos que aunque la GPT se correlaciona con el pH, esta correlación es mucho menor que para la GOT y que no se

correlaciona con el resto de marcadores de gravedad (lactato, puntuaciones Apgar, glutamato) reafirmandonos en su función menor en el metabolismo glutamatérgico. Se han llevado a cabo varios ensayos clínicos en animales y humanos, algunos realizados por nuestro grupo de trabajo (*Campos et al*), en los que se demuestra la utilidad de la **GOT** como diana terapéutica en el infarto cerebral y en el daño cerebral postraumático.

En 2011, *Campos et al* demostraron en estudios experimentales con ratas sometidas a isquemia por oclusión de la arteria cerebral media, que la administración iv de bolos de *oxaloacetato* (co-sustrato necesario para que la GOT metabolice el glutamato) favorecía la eliminación del glutamato de la sangre y reducía el edema y el volumen de la zona infartada^{257,258}. El problema con el uso del *oxaloacetato* reside en que para lograr los efectos observados en animales, se requerirían altas dosis, con las limitaciones, sobre todo de toxicidad, que ello supone²⁵⁹. Tras estos hallazgos, se pensó en el uso de la GOT recombinante (rGOT) sola o suplementada con dosis bajas de oxaloacetato. *Campos et al* y otros autores también vieron que la administración de rGOT inducía una reducción de la concentración sérica y cerebral de glutamato y del volumen de infarto^{257,260}. Objetivaron que este efecto protector se potenciaba al administrar conjuntamente pequeñas dosis de oxaloacetato, superando así los problemas derivados de las altas dosis del tratamiento aislado con oxaloacetato²⁶¹. Con ello, concluyeron que el uso de la rGOT podría ser un tratamiento prometedor, ya que era improbable que causara efectos secundarios, pues sus niveles ya son muy variables en personas sanas (7-45 UI/L) y se ha visto que se incrementan en más de 10 veces en el daño hepático. Además, vieron que los efectos del tratamiento con rGOT no duraban más de 24 horas con lo que se reduciría el potencial efecto adverso a largo plazo. El problema con el que se encontraron es que la dosis efectiva de GOT (12,88 µg por 100 g) usada en animales no podía ser extrapolada a humanos, ya que los niveles de GOT en ratas son 10 veces más altos que en humanos (10 UI/L en humanos frente a 95 UI/L en ratas). Además, la dosis eficaz de oxaloacetato como coadyuvante de las altas dosis de GOT podría no ser tolerada en humanos, ya que para contrarrestar su acidez y mantener un pH neutro se necesitarían grandes dosis de hidróxido de sodio (NaOH). Otra limitación que observaron es que las enzimas limpiadoras tienen una ventana terapéutica estrecha, siendo efectivas cuando se administran entre 30 y 60 minutos tras el evento isquémico, pero perdiendo su efecto tras 120 minutos. Por lo tanto, por el momento se necesitan

más ensayos clínicos para valorar la dosis efectiva de rGOT en humanos.

En la población pediátrica, el papel de la GOT en el mantenimiento de la homeostasis glutamatérgica es aún más importante, si cabe, que en los adultos. Se sabe que en la sangre fetal y neonatal de los RN sanos existen concentraciones superiores de glutamato y GOT que en los adultos y que ambas concentraciones guardan una correlación directa, lo que confirma el papel crucial que el glutamato tiene en el neurodesarrollo y la GOT, como enzima de producción endógena del organismo, en el mantenimiento de su equilibrio, de forma que los incrementos de GOT están mediados por la liberación de glutamato. En nuestro estudio, hemos observado concentraciones de GOT en niños sanos (en los controles) de $34,9 \pm 18,2$ UI/L, similares a las encontradas en otros estudios previos pediátricos (39 ± 2 UI/L²²⁹ y $23,46 \pm 8$ UI/L²⁶²), concentraciones superiores a las descritas para los adultos sanos ($18,7 \pm 3,8$ UI/L²⁶¹ y 19 ± 1 UI/L²²⁹) y al analizar lo que ocurre en situación de acidosis en riesgo de resultados neurológicos adversos, vemos que estas concentraciones son todavía más altas y se correlacionan positivamente con los niveles de glutamato y con otros indicadores de gravedad como son el lactato y las puntuaciones Apgar, defendiendo una vez más el papel de la GOT como enzima endógena de defensa del organismo frente a las elevaciones de glutamato. Ahora bien, en las situaciones de hipoxia-isquemia puede producirse **daño hepático** con una hipertransaminasemia transitoria entre otros hallazgos clínicos^{79,263}, por lo que las elevaciones de GOT objetivadas en nuestro grupo de casos pudieran justificarse por este hecho. Nosotros tenemos diferentes argumentos que apoyan que dichas elevaciones se producen en respuesta a los incrementos de glutamato como mecanismo endógeno de defensa:

1. Los RN sanos tienen concentraciones superiores de glutamato y GOT que los adultos, lo que no podría ser explicado por hipoxia hepática.
2. Tanto en los niños sanos como en los acidóticos, el glutamato y la GOT se correlacionan linealmente (a mayores concentraciones de glutamato mayores de GOT, y viceversa).
3. La enzima GOT no está asociada independientemente con la asfixia. Solamente el glutamato y el Apgar son marcadores independientes de asfixia perinatal.

4. En estudios realizados en adultos tras isquemia, se objetivó que aquellos con buenos resultados neurológicos mostraban concentraciones más bajas de glutamato y más altas de GOT en sangre y que las concentraciones elevadas de glutamato y bajas de GOT se correlacionaban con el deterioro neurológico precoz. También se observó una correlación inversa entre el área de infarto y las concentraciones de GOT y una correlación positiva con las de glutamato^{264,265}.
5. No hemos encontrado diferencias en las concentraciones de GPT entre los casos y controles y ésta es una enzima de producción casi exclusivamente hepática, mucho más específica del hígado que la GOT que puede originarse también en el miocardio, músculo estriado, páncreas, riñón, eritrocitos y en el SNC. De hecho, la GPT se ha usado como marcador de daño hepático en distintas enfermedades como en las hepatitis virales, hepatitis autoinmunes o en la enfermedad grasa del hígado no alcohólica²⁶⁶⁻²⁷⁰ y se mantiene como la enzima fundamental para definir la hepatitis hipóxica, considerando patológicas las concentraciones por encima de 2 veces el valor normal. En base a las concentraciones consideradas normales (60 UI/L para los niños y 55 UI/L para las niñas <18 meses de edad), extrapoladas del estudio Europeo realizado en 2009⁸⁰ en niños sanos hijos de madres infectadas por el virus de la hepatitis C, en los que se descartó la infección, vemos que ninguno de nuestros niños ha superado en 2 veces el límite superior considerado normal. Aún teniendo en cuenta la definición de función hepática definitivamente anormal referida por *Shellhass et al*⁸² (consideran función hepática definitivamente anormal con niveles de enzimas $\geq 300\%$ el valor medio de los controles, y cifras normales de 7-35 UI/L para la GPT y 2-70 UI/L para la GOT), los valores medios de nuestros casos para la GOT (83,1 UI/L) y GPT (24,3 UI/L) no superan el 300% de los valores medios de nuestros controles para la GOT (104,7 UI/L) y GPT (31,2 UI/L), excluyéndose que la elevación de las transaminasas pueda justificarse por hepatitis hipóxica.
6. Tampoco hemos observado diferencias en las concentraciones de GGT entre los casos y los controles. La GGT es una enzima que se eleva en diversas patologías hepáticas, sobre todo que afectan a las células biliares dada su localización en el interior celular del epitelio biliar. También se encuentra en las membranas celulares del bazo, corazón, cerebro, páncreas, vejiga, riñones y vesículas

seminales. Participa en el metabolismo del glutatión, en el control de la homeostasis del estrés oxidativo y de hecho, recientemente ha demostrado ser un marcador de riesgo cardiovascular²⁷¹. En el RN a término su actividad es 6 a 7 veces superior a la del adulto y luego disminuye para igualarse a la del mismo a los 5-7 meses²⁷⁰. *Soldin et al* confirman la alta actividad de la GGT en menores de 6 meses y como se ha mencionado previamente, en el analizador 500 Vitros dan como normal una GGT de 30-177 UI/L para los niños y de 23-156 UI/L para las niñas de 1-7 días de vida⁸¹. Teniendo en cuenta los valores considerados normales, en nuestro grupo de niños, tanto en los casos como en los controles, no se supera en 2 veces el valor considerado normal referido.

7. La capacidad protectora de la GOT para metabolizar el glutamato sanguíneo y reducir el incremento de glutamato cerebral, además de en la patología isquémica cerebral, también se ha documentado en otras neuropatologías, como en el daño cerebral postraumático, la hemorragia subaracnoidea, la migraña y el glioma²⁷².

Por otro lado, la enzima GOT puede tener un origen muscular y que sus elevaciones sean secundarias a **daño muscular** hipóxico-isquémico. Por ello, como principal marcador muscular, hemos medido las cifras de CK y no hemos hallado diferencias entre casos y controles, no pudiendo justificar que los incrementos de GOT se deban a daño muscular. En niños sanos la CK sérica se considera normal entre 70-380 UI/L al nacimiento⁸⁷. En nuestro laboratorio, se consideran cifras normales entre 39 y 308 UI/L. Nosotros hemos observado, tanto en el grupo de casos como en el grupo de controles, concentraciones medias de CK dentro del rango normal ($145,83 \pm 125,5$ UI/L y $107,74 \pm 65,12$ UI/L, respectivamente) y como en otros estudios, vemos que estas concentraciones son superiores a las de los adultos y que no difieren según el peso o el sexo al nacimiento. Así es que, *Sutton et al*²⁷³ refieren que los RN sanos tienen cifras medias de CK en sangre de cordón de 156,8 UI/L (rango de 80-288 UI/L) y que alcanzan el pico a las 24 horas de vida, cifras superiores a las de los adultos en los que consideran cifras normales entre 23 a 99 UI/L. Además, no encuentran diferencias en los valores de CK al nacimiento según el sexo. *Bodensteiner et al*²⁷⁴ también demostraron concentraciones más elevadas de CK en los niños sanos durante el primer año, con un pico a las 24 horas de vida. La razón de estas elevaciones de CK en los RN sanos no está clara, pero al igual que en los ancianos en los que la CK se encuentra

elevada tras ejercicio, trauma, quemadura o inyecciones im, se cree que estas elevaciones se podrían relacionar con el propio trauma de parto.

A su vez, la CK es una enzima reconocida que representa daño tisular. *Cao et al*²⁷⁵ también demostraron niveles altos de CK en sangre de cordón de RN sanos y con pico a las 24 y 48 horas, pero los valores eran mucho más altos en las situaciones de estrés perinatal como hipoxia o verdaderas dificultades en el parto, así es que objetivaron concentraciones más bajas en los nacidos por cesárea y más altas en los nacidos por parto de nalgas, estrés perinatal o hipoxia. De hecho, se ha visto que la CK puede ser un marcador no específico y precoz de hipoxia y que el punto de corte para formas de EHI moderada a severa es verdaderamente elevado y se localiza en torno a cifras de CK por encima de 1.000 UI/L²⁷⁶. En el trabajo de *Hayakawa et al*²⁷⁷ también se demostró que las concentraciones de lactato y CK eran significativamente más elevadas en sangre al nacimiento en el grupo de niños con EHI con resultados neurológicos pobres en comparación con el grupo con resultados favorables, refiriendo concentraciones medias de lactato y CK en el grupo de resultados neurológicos pobres de 11,9 mmol/L y 1.022 UI/L respectivamente, muy superiores a las consideradas normales. En este mismo sentido, *Warburton et al*²⁷⁸ midieron las concentraciones de CK en RN con menos de 4 horas de vida y encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones de los niños que murieron por asfixia, las de los supervivientes sanos y las de los niños que murieron por otras causas no relacionadas con la asfixia, de forma que los pacientes que murieron a consecuencia de la asfixia tenían concentraciones muy superiores de CK (CK 11.034 UI/L en los fallecidos por asfixia, 277 UI/L en los fallecidos por otras causas y 328 UI/L en los supervivientes sanos). Así es que, se ha postulado que el determinar el punto de corte de este y otros marcadores bioquímicos sistémicos (como LDH, ácido úrico y lactato) pueden ayudar al clínico de forma precoz incluso a diferenciar entre formas leves y otros estadios más graves de EHI y orientar el tratamiento²⁷⁹.

Nosotros, al igual que otros investigadores como *Warburton et al*²⁷⁸, no objetivamos relación entre las concentraciones de CK y el tipo de parto, aunque sí los nacidos por PI son los que presentan las concentraciones más altas seguidos por los nacidos por Cx y por PEV (158,41 UI/L; 121,28 UI/L y 102,76 UI/L respectivamente). Esto quizás pudiera justificarse por la precocidad en la determinación de la CK, no habiéndose

alcanzando todavía el pico o porque solo los partos verdaderamente traumáticos suponen daño con representación en las concentraciones de CK, siendo probable que en nuestro grupo de pacientes el parto no haya jugado un papel importante en este sentido pues no objetivamos relación entre el mismo y el pH. Ahora bien, en las situaciones de hipoxia las concentraciones de CK que se alcanzan son muy superiores a las referidas para los RN sanos y se elevan precozmente en las primeras horas de vida, por lo que el no haber objetivado diferencias entre nuestro grupo de casos con respecto al control hace que nos reafirmemos en la ausencia de daño muscular esquelético hipóxico en el grupo de casos y que las elevaciones de GOT se puedan justificar por este hecho. Además, tampoco observamos correlación entre las cifras de CK y otros indicadores de gravedad de hipoxia-isquemia como son el pH, el lactato, las puntuaciones Apgar y el glutamato.

En las situaciones de hipoxia-isquemia, lo que más preocupa es el daño neurológico por las implicaciones que ello conlleva, pero no debemos olvidar que se pueden comprometer otros órganos y sistemas con importantes repercusiones para el paciente.

Coincidiendo con lo publicado en otros estudios, nosotros también vemos que el órgano **sistémico** más comúnmente afectado es el **riñón**. Así es que, en nuestro grupo de casos, de los 6 niños que presentaron alguna forma de compromiso sistémico, 4 tuvieron datos compatibles con IRA⁵², 2 de ellos (N8 y N13) presentaban a su vez datos de EHI y 2 no (N5 y N22), lo que supone una incidencia del 17,4% de IRA en el grupo de casos y del 40% en EHI. La incidencia de IRA en los RN a término asfixiados es muy variable según distintos estudios, desde un 7-72%^{84,86,280,281} y es probable que la afectación renal en nuestro grupo de casos incluso sea mayor de la objetivada, ya que nosotros hemos empleado la elevación de la creatinina sérica y la disminución del filtrado glomerular como criterios básicos para hablar de daño renal agudo y tal y como se expone en otros estudios, estos criterios son limitados a la hora de valorar el daño renal y con el empleo añadido de otros biomarcadores séricos y urinarios, como la albúmina, la beta-2 microglobulina, la cistatina c, el factor de crecimiento epidermal, la osteopontina y la uromodulina se podría aumentar la sensibilidad en la valoración del daño renal agudo²⁸¹. Por otro lado, también vemos que en nuestro grupo de casos hay pacientes con afectación renal que no presentaron clínica de EHI, coincidiendo con lo publicado en otros estudios en los que se refiere la posibilidad de clínica extraneurológica sin

sintomatología de EHI en los RN asfícticos⁵⁰.

Desde un punto de vista **cardíaco**, las concentraciones de troponina I superiores a 0,15 µg/L se consideran definitivas de daño miocárdico⁹⁴, el punto de corte óptimo en sangre de cordón para predecir hipoxia perinatal se ha establecido en 0,35 µg/L⁹³ y para predecir riesgo elevado de mortalidad precoz en 4,6 µg/L²⁸², lo que coincide con nuestros hallazgos, así pues de los dos casos que presentaron formas de EHI moderada-grave (N8 y N21) ambos tuvieron concentraciones de troponina cardiaca I superiores a 0,35 µg/L (5,094 y 0,423 µg/L, respectivamente) y las concentraciones del caso N8 que falleció en las primeras horas de vida fueron superiores al punto de corte considerado predictor de mortalidad precoz.

A parte de las líneas de investigación terapéuticas centradas en el ciclo del glutamato, en los últimos años se han estudiado **numerosos tratamientos**²⁸³, pero por el momento, se necesitan más estudios que valoren la seguridad y la eficacia de estas terapéuticas en niños con EHI, de forma concomitante o no a la hipotermia.

Se ha propuesto el conocido como “**postcondicionamiento isquémico remoto**” que consiste en provocar una isquemia intermitente y controlada remota al órgano afectado y sobre un órgano no vital, como por ejemplo en un miembro. Aunque el mecanismo protector del postcondicionamiento isquémico no es completamente conocido, se piensa que envuelve 3 vías, humoral, neuronal y sistémica, que por distintos e interrelacionados mecanismos convergen en el SNC incrementando el flujo sanguíneo cerebral, atenuando la neuroinflamación y activando cascadas de señalización para la supervivencia celular²⁸⁴.

La **melatonina** también se ha propuesto como un potente neuroprotector. Además, de su papel bien conocido en el establecimiento de los ritmos circadianos, tiene funciones en el crecimiento y desarrollo, en la reproducción y la respuesta inmune. Se sabe que participa en el neurodesarrollo y como mecanismo endógeno de protección en el daño cerebral frente a la isquemia^{285,286}, ya que sus niveles se incrementan en plasma de 6 a 15 veces tras un evento hipóxico-isquémico^{287,288} y a través de procesos anti-oxidantes, anti-apoptóticos y anti-inflamatorios, reduce el daño oxidativo y aminora el fallo energético secundario cerebral^{289,290}.

Los **canabinoides** también pueden tener un papel neuroprotector endógeno. Participan en el neurodesarrollo normal y se incrementan durante la isquemia cerebral, modulando la intensidad y extensión de los procesos neurotóxicos y la respuesta inflamatoria^{291,292}. En modelos animales de asfixia perinatal se ha visto la utilidad de los canabinoides, sobre todo del canabinoide WIN55212-2 que protege frente al daño mitocondrial y previene la apoptosis^{293,294}. No existen ensayos clínicos en humanos y además, dado que los canabinoides se acumulan selectivamente en el SNC y tienen un aclaramiento relativamente lento, se precisan primero ensayos preclínicos de farmacocinética antes de ensayos que valoren su uso en la EHI.

La **eritropoyetina (EPO)** juega un papel en el desarrollo cerebral normal y en la neuroprotección. Los receptores de EPO (EpoR) se localizan en las neuronas, la glía y las células endoteliales, participando en la proliferación y diferenciación celular. En la hipoxia se activa el factor hipoxia-inducible que induce la expresión de EPO y EpoR, ejerciéndose mecanismos anti-apoptóticos, anti-oxidantes y anti-inflamatorios. Se estimula la neurogénesis, la oligodendrogénesis y angiogénesis. En estudios animales de asfixia perinatal, se ha visto que la EPO reduce la pérdida de volumen cerebral, mejora los resultados cognitivos y motores y aumenta la neuroprotección conferida por la hipotermia^{295,296}. En estudios fase I/II en humanos prematuros y a término usando EPO, no se identificaron efectos adversos del tipo policitemia, trombosis o hipertensión como se habían visto en adultos. Existen algunos ensayos en niños comparando la EPO sola o asociada con la hipotermia, pero la dosis y el régimen óptimo de tratamiento todavía se desconoce^{297,-299}.

El **alopurinol** y su metabolito oxipurinol inhiben a la xantina oxidasa, la cual es responsable de la producción de radicales superóxido durante la reperusión. También remueve los radicales “hidroxilo”, ayuda a la quelación de iones metálicos e inhibe la acumulación de neutrófilos. Diferentes estudios, como el de *Palmer et al*³⁰⁰ en ratas recién nacidas, el de *Gunes et al*³⁰¹ en RN asfixiados y el de *Torrance et al*³⁰² en gestantes con signos fetales de hipoxia, entre otros, demostraron las propiedades neuroprotectoras del alopurinol. En 2012, se publicaron los resultados del seguimiento a largo plazo (4-8 años) de 2 estudios previos realizados con dosis altas de alopurinol en RN asfícticos y con resultados prometedores, pues aunque no objetivan diferencias entre el grupo tratado con respecto al grupo control, al analizar el subgrupo de EHI moderada

por separado sí observan menos resultados adversos en el grupo tratado con alopurinol³⁰³.

El *sulfato de magnesio* ($MgSO_4$) ha demostrado tener un efecto neuroprotector fundamentalmente en RN prematuros. No está claro totalmente su mecanismo de acción, pero se conoce que impide la entrada de calcio al interior celular por inhibición no competitiva del receptor NMDA³⁰⁴, además de reducir la lesión inducida por la inflamación al estabilizar la membrana celular e inhibir la formación de radicales libres³⁰⁵. En un modelo de lesión hipóxico-isquémica en cultivo de células de rata, *Itoh et al* demostraron que las células precursoras de oligodendrocitos expuestas a $MgSO_4$ mostraron mayor resistencia a la hipoxia-isquemia durante el período en que se diferenciaron en oligodendrocitos³⁰⁶. Ello sugiere que el $MgSO_4$ acelera la diferenciación de las células del linaje oligodendrocítico, lo que contribuye a la protección de la sustancia blanca contra el estrés hipóxico-isquémico y debido a que no protege a los oligodendrocitos maduros, estaría fundamentalmente recomendado en los neonatos prematuros. Así es que, varios estudios han mostrado que la administración de $MgSO_4$ a mujeres embarazadas con riesgo de nacimiento prematuro, tiene efectos neuroprotectores y reduce el riesgo de parálisis cerebral³⁰⁷⁻³⁰⁹. En modelos en ratas de experimentación, se objetivó que la administración adyuvante de $MgSO_4$ a la hipotermia mejoraba las propiedades neuroprotectoras de la misma³¹⁰, pero por el momento su uso se restringe a los niños prematuros.

El *topiramato* es un anticonvulsivante con varias funciones, incluyendo la inhibición de los receptores del glutamato AMPA y Kainato y bloqueo de los canales de Na. En modelos animales, se ha demostrado que reduce el daño cerebral. *Filippi et al*³¹¹ realizaron un estudio en 2 grupos de RN hipóxicos, unos tratados con hipotermia y otros tratados con hipotermia y topiramato, encontrando diferencias en los resultados a largo plazo, los ratios de supervivencia y los hallazgos en RM cerebral a favor del grupo de tratamiento combinado. Todavía se necesitan más estudios que evalúen el papel del topiramato en la EHI neonatal.

El *xenón* es un gas monoatómico que atraviesa fácilmente la barrera hematoencefálica. Se ha visto que ejerce efectos neuroprotectores al inhibir el receptor NMDA del glutamato y reducir la apoptosis por activación de factores anti-apoptóticos. En distintos

modelos animales de hipoxia-isquemia, se vio que reducía el daño cerebral y que tenía una mayor eficacia cuando se usaba en combinación con la hipotermia³¹². *Azzopardi et al*³¹³ realizaron un ensayo clínico en niños tras asfixia comparando el uso de xenon inhalado con hipotermia frente al uso de hipotermia sola y vieron que no existían diferencias en los hallazgos en RM y que en el grupo del xenón se objetivaban efectos adversos (necrosis grasa subcutánea y desaturación transitoria durante la realización de la RM). Además, el uso del xenón requiere de entrenamiento y de un equipamiento especializado, por lo que sigue siendo difícil su uso en la práctica clínica.

Otro gas noble que se ha estudiado en modelos animales es el **argón**. Este gas ejerce su efecto neuroprotector al inducir la expresión del factor nuclear eritroide-2 (Nrf2) que media la protección celular frente al estrés oxidativo, con la estimulación de la transcripción de proteínas antioxidantes³¹⁴. Dado que es un gas más barato que el xenón, se abre las puertas a un futuro tratamiento para la EHI y más económico. Por el momento se necesitan más estudios y valorar su uso en humanos.

En los últimos años, se han realizado ensayos clínicos en animales sometidos a hipoxia perinatal usando **células madres** con resultados prometedores. Se ha visto que podrían tener un efecto potenciador o sinérgico usadas conjuntamente con la hipotermia³¹⁵. Las células madre son células con capacidad de auto-renovación y diferenciación. Actúan reemplazando el tejido perdido y protegiendo a las células dañadas, proporcionando un soporte trófico y aminorando la respuesta inflamatoria. A día de hoy se necesitan más ensayos clínicos que evalúen el tipo de célula madre, la dosis, la ruta de administración...³¹⁶⁻³¹⁸.

El problema real existente que tenemos es que ninguno de estos tratamientos se ha mostrado eficaz³¹⁹. Hasta la fecha, solamente se ha demostrado la eficacia y seguridad de la **hipotermia terapéutica** a 33-34°C durante 72 horas. Los beneficios de la hipotermia se objetivaron en los primeros ensayos clínicos realizados, mostrando buenos resultados a los 18 meses de seguimiento (ofrecía una reducción del 11% en el riesgo de muerte o discapacidad)⁹⁹⁻¹⁰¹ y en el año 2014, se vio que estos beneficios también persistían en la infancia a los 6-7 años¹⁴⁹. Se han probado otras modalidades de enfriamiento corporal, bajando más la temperatura o aumentando los tiempos de enfriamiento, pero con ninguna de ellas se ha demostrado ventajas con respecto a la

modalidad clásica³²⁰⁻³²², a pesar de que en ensayos clínicos realizados en animales se vieron diferentes efectos neuroprotectores al variar las temperaturas de enfriamiento³²³⁻³²⁷ e incluso, que determinadas temperaturas podrían beneficiar más a unos tejidos cerebrales que a otros (en el estudio de *Iwata et al*³²² realizado en cerdos, vieron que enfriando a 5,5 °C se reducía la muerte neuronal en la sustancia gris cortical y enfriando a 3,5°C se obtenía más beneficio en la sustancia gris profunda). Aún así, todavía siguen existiendo dudas sobre el punto de corte que determina la normotermia y sobre cuál podría ser el mejor protocolo de enfriamiento para obtener una mayor neuroprotección, pero lo que sí está claro es que cuanto antes se inicie mejores serán los resultados, como demuestra *Thoresen et al*³²⁸ en RN sometidos a hipotermia en las primeras 3 horas de vida. Por otro lado, es bien conocido que en la EHI, así como en otros procesos isquémicos en adultos, la prevención de la hipertemia³²⁹⁻³³¹ y el sobreenfriamiento son tan importantes como la hipotermia terapéutica, hasta el punto que en el ensayo clínico realizado por *Nielsen et al*³³² en adultos tras parada cardíaca, se concluyó que 24 horas de enfriamiento a 33°C o mantener estrictamente una temperatura de 36°C evitando el sobreenfriamiento y la hipertermia promovían una neuroprotección equivalente.

Existen dos vías metabólicas que potencialmente pueden verse afectadas por el sobreenfriamiento, como son la del Factor inducible por hipoxia 1 α (HIF-1 α) y la producción de radicales libres. El HIF-1 α se incrementa en las horas siguientes a un periodo de hipoxia y da lugar a una sobreexpresión de los genes asociados a la eritropoyesis y la angiogénesis. Se incrementa la expresión de EPO, la cual ha mostrado tener un efecto neuroprotector en modelos neonatales con EHI. Sin embargo, el conocimiento del papel de HIF-1 α en la neuroprotección no es completo y tanto su incremento como su disminución se tienen asociados con reducción de la apoptosis tras la EHI, por lo que probablemente su efecto dependa más del equilibrio en sus niveles y de los tiempos de su activación. Con la hipotermia profunda se suprime la activación de HIF-1 α y su efecto neuroprotector y se incrementa la producción de radicales libres con sus efectos negativos consecuentes.

En los últimos años, se han reportado advertencias en relación con la hipotermia en pacientes con procesos infecciosos. En un ensayo clínico en adultos con meningitis bacteriana grave, se observó que la hipotermia terapéutica no mejoraba los resultados con respecto a los pacientes no enfriados e incluso, que podía ser perjudicial³³³. En un

pequeño estudio prospectivo en el que se analizó la histología de la placenta y los hallazgos en la RM en RN asfixiados, se comprobó que la hipotermia terapéutica fue menos neuroprotectora en los niños cuyas placentas mostraban corioamnionitis³³⁴. *Jenkins et al*³³⁵ investigaron el efecto de la hipotermia terapéutica en la modulación de la respuesta inmune periférica en las primeras 72 horas tras el nacimiento en 65 niños con EHI. Vieron que en el grupo de la hipotermia, aquellos que recuperaban las cifras de neutrófilos tras el recalentamiento tenían mejores resultados a largo plazo que aquellos que continuaban con cifras bajas. Por todo ello, todavía se necesita profundizar más en las modalidades de tratamiento con hipotermia y en el papel que la misma puede tener al modificar la respuesta inmune del organismo.

En **resumen**, a pesar de sus limitaciones, la hipotermia continúa siendo la única terapéutica eficaz en la EHI, por lo que es necesario mejorar los conocimientos en la fisiopatología de la enfermedad y el desarrollo de nuevas armas terapéuticas que de forma coadyuvante a la misma nos permitan mejorar el pronóstico de estos pacientes. En este sentido, es crucial el desarrollo de nuevos ensayos clínicos para refinar y optimizar el protocolo de enfriamiento, de forma que podamos ofrecer modalidades distintas de tratamiento con hipotermia y otras terapias neuroprotectoras adyuvantes, sobre todo en los pacientes indetificados como de alto riesgo, aquellos que en base a distintos marcadores pronósticos se consideran con mayor riesgo de presentar una evolución adversa a corto y a largo plazo. Nosotros defendemos el papel de la GOT como enzima endógena de defensa frente a las elevaciones de glutamato en la hipoxia-isquemia perinatal y nuestros esfuerzos actualmente se centran en esta diana terapéutica, en la búsqueda de tratamientos que nos permitan potenciar la GOT propia del organismo.

VI. CONCLUSIONES



1. El pH es un buen marcador de riesgo de hipoxia-isquemia perinatal, ya que existe correlación entre el $\text{pH} \leq 7,1$, considerado de riesgo de resultados neurológicos adversos, y otros marcadores de riesgo, como son las puntuaciones en el test de Apgar, la necesidad de reanimación al nacimiento y las concentraciones de lactato.
2. La acidosis con $\text{pH} \leq 7,1$ es un factor de riesgo mayor para EHI y mortalidad precoz, pero por si solo no indica inexorablemente resultado adverso. No se puede sospechar un resultado adverso solamente por la valoración aislada del pH. Objetivamos una influencia significativa de la acidosis con $\text{pH} \leq 7,1$ en los resultados a corto plazo: tenemos una incidencia del 21,7% de EHI (8,7% de EHI moderada-grave) y del 4,3% de mortalidad (un 20% de mortalidad en EHI). Sin embargo, el valor del pH presenta limitaciones para predecir los resultados a largo plazo de los pacientes, de hecho nosotros no hemos objetivado diferencias en las puntuaciones medias en cada uno de los 3 dominios de la escala de desarrollo infantil Bayley III entre el grupo de casos y el grupo de controles.
3. En nuestro estudio un 21,6% de los pacientes con pH de riesgo han tenido afectación extraneurológica (renal 17,4%, cardíaca 8,7%, hepática 4,3% e intestinal 4,3%). Puede existir afectación extraneurológica sin sintomatología de EHI en los RN con pH de riesgo ($\text{pH} \leq 7,1$).
4. Los neonatos con acidosis en riesgo de resultados neurológicos adversos, tienen concentraciones significativamente más altas de glutamato y GOT séricas que los controles (papel crucial del glutamato y de la GOT en el daño hipóxico-isquémico). Las concentraciones séricas de glutamato y GOT guardan correlación con la severidad de la acidosis, de forma que a mayor acidosis, mayores son las concentraciones de glutamato y GOT. A su vez, glutamato y GOT mantienen una correlación positiva (GOT como principal enzima limpiadora de glutamato). Se evidencia asimismo, una relación positiva y significativa entre las concentraciones de glutamato y GOT y otros indicadores de gravedad, como son el lactato y las puntuaciones Apgar.
5. No existen diferencias en las concentraciones de GPT, GGT y CK entre los pacientes con $\text{pH} \leq 7,1$ y con $\text{pH} > 7,1$. Ninguna de estas tres enzimas se

correlacionan con las concentraciones de glutamato, y solamente la GPT guarda una correlación con el pH (enzima con un papel menor en el metabolismo del glutamato). Las diferencias en las concentraciones de GOT de los casos con respecto a los controles no se justifican por daño hepático (no observamos diferencias en las concentraciones de GPT y GGT entre los casos y los controles) ni por daño muscular (no objetivamos diferencias en las concentraciones de CK entre los casos y los controles).

6. Hay una mayor incidencia de acidemia e hiperlactacidemia en los varones en nuestro estudio). Esta mayor vulnerabilidad del sexo masculino a la acidosis de riesgo no se justifica por las concentraciones de glutamato ni de GOT ni GPT, pues no se existe correlación entre dichas concentraciones y el sexo.
7. Los datos aportados sobre el glutamato en la acidosis perinatal apoyan la necesidad de continuar con la búsqueda de tratamientos que actúen en este punto de la fisiopatología de la enfermedad hipóxico-isquémica. Valoramos el papel de la GOT como enzima limpiadora de glutamato, actuando como un potencial mecanismo de protección endógeno del organismo frente a las elevaciones de glutamato.
8. Se necesita profundizar más en la fisiopatología de la anoxia perinatal, en refinar y optimizar el protocolo de enfriamiento y en el desarrollo de nuevas armas terapéuticas que de forma coadyuvante a la hipotermia permitan mejorar el pronóstico de los pacientes con EHI, sobre todo en los pacientes considerados de alto riesgo. En este sentido, la GOT endógena puede ser una diana terapéutica y es esperable que su potenciación junto con el tratamiento con hipotermia produzca un mayor efecto beneficioso, pero por el momento, se necesitan más investigaciones encaminadas al desarrollo de fármacos que potencien a la GOT endógena del organismo.

VII.LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN Y PROYECTOS FUTUROS



Se ha visto que el seguimiento de los pacientes con EHI debe realizarse de forma estrecha y durante un largo periodo de tiempo, ya que algunos de los niños que no presentan alteraciones durante los primeros años de vida pueden presentar alteraciones menores en edades posteriores (la mayoría de los metaanálisis que evalúan la eficacia del tratamiento con hipotermia realizan un seguimiento de los pacientes hasta los 18 meses de vida). Mientras las formas moderadas a graves son las que presentan una mayor incidencia de secuelas y generalmente más graves y evidentes durante la infancia temprana, las formas de EHI leves, consideradas hasta hace unos años como “benignas”, han mostrado que, aunque durante los primeros años estos pacientes no muestran alteraciones groseras, sí pueden presentar alteraciones menores en etapas más tardías del desarrollo, manifestadas fundamentalmente como trastornos del comportamiento, trastorno por déficit de atención e hiperactividad, trastornos de lenguaje, entre otros. Por lo tanto, nosotros debemos seguir a nuestros pacientes al menos hasta la edad escolar y aunque la mayoría no han sido etiquetados ni siquiera como formas leves de EHI, es posible que la acidosis con $\text{pH} \leq 7,1$ al nacimiento tenga una influencia en el desarrollo de trastornos menores a largo plazo.

Se han diseñado diversos ensayos clínicos en la búsqueda de nuevos tratamientos frente a la EHI, pero hasta el momento solamente se ha demostrado la eficacia de la hipotermia. Nosotros mantenemos la línea de investigación de la GOT, pero hasta la fecha, dadas las limitaciones terapéuticas que supone el oxaloacetato y la rGOT sobre todo en lo que se refiere a su dosificación, ningún tratamiento que actúe a este nivel se ha probado en ensayos clínicos en humanos. Con el objetivo de buscar nuevas estrategias capaces de reducir los niveles de glutamato plasmático y que pudieran ser rápidamente trasladables a la práctica clínica, el grupo de Neurología con el que trabajamos activamente está realizando un cribado de fármacos para reposicionamiento con actividad sobre la GOT y consecuentemente, con potencial aplicación en la patología isquémica. Esperamos que en un futuro no muy lejano se obtenga alguna molécula con un potencial efecto beneficioso en este sentido y trasladable a la práctica clínica.





VIII. ANEXOS



1. Test de Apgar

El test de Apgar fue propuesto por Virginia Apgar en el año 1952 como método para evaluar la condición física de los niños tras el nacimiento³³⁶. Evalúa 5 parámetros (frecuencia cardíaca, respiración, coloración, respuesta a estímulos y tono) que se puntúan de 0 a 2 puntos (*Tabla 37*). El score total es la suma de las puntuaciones de los 5 parámetros analizados y un score ≥ 7 indica que la condición del niño es buena. Se realiza al minuto y a los 5 minutos de vida y permite una rápida evaluación de la condición del RN. El valor a los 5 minutos es un mejor predictor de la supervivencia del niño¹⁷⁹ y de hecho, puntuaciones entre 0 y 3 dan información sobre el alto riesgo de mortalidad neonatal temprana. Por ello, el apgar a los 5 minutos continúa siendo un predictor de mortalidad neonatal precoz³³⁷. Ahora bien, hay que tener presente que este test tiene limitaciones a la hora de identificar la asfixia perinatal y en la predicción de resultados neurológicos adversos³. Así pues, pueden existir puntuaciones bajas y que no se deban a una situación de asfixia, por ejemplo cuando existen anomalías congénitas, en niños prematuros y en las situaciones de sedación materna.

Puntuación/ Parámetro	0	1	2
Coloración piel	Azul o pálido	Cuerpo rosado y extremidades azuladas	Cuerpo totalmente rosado
Frecuencia cardíaca	Ausencia de latido	<100 lpm	>100 lpm
Respiración	Ausente	Lenta e irregular	Buena con llanto
Tono muscular	Flácido	Extremidades ligeramente flexionadas	Movimiento activo
Irritabilidad refleja	Sin respuesta	Se queja o hace muecas	Llanto, tos, estornudos, movimiento

Tabla 37: Test de Apgar.

(lpm: Latidos por minuto)

2. Velocidad media (Vm), Índice de resistencia vascular (IR) e Índice de pulsatibilidad (IP) en eco-doppler cerebral

El área bajo la curva que se observa con el doppler es el reflejo del flujo sanguíneo cerebral y permite calcular la Vm.

El IP es el valor resultante de la diferencia de la velocidad sistólica máxima menos la velocidad diastólica mínima entre la velocidad media durante el ciclo completo.

$$IP = (Velocidad\ sistólica\ máxima - velocidad\ diastólica\ mínima) / Vm$$

Uno de los valores más difundidos de la ecografía doppler vascular es el IR desarrollado por Léandre Pourcelot, el cual refleja la resistencia al flujo arterial originado por el lecho microvascular distal al sitio de la medición. Se emplea en arterias que no tienen flujo reverso y el valor máximo que puede alcanzarse es igual a uno, dado que el IR es la diferencia de la velocidad sistólica máxima menos la velocidad diastólica final, dividido entre la velocidad sistólica máxima.

$$IR = (Velocidad\ sistólica\ máxima - velocidad\ diastólica\ final) / velocidad\ sistólica\ máxima$$

Para realizar la ecografía doppler transfontanelar y medir el IR hay que colocar el transductor en la fontanela anterior, de tal forma que se realice un corte sagital medio y así poder visualizar en tiempo real las pulsaciones generalmente de la arteria pericallosa. Para la realización de una correcta toma de la muestra del doppler en la arteria pericallosa hay que situarse justo delante de la rodilla del cuerpo calloso. Se sabe que la mejor señal doppler se obtiene haciendo que el haz del ultrasonido y el eje del vaso estén lo más próximo a 0°.

En relación a los factores que influyen en el IR, se ha visto que los valores normales varían fundamentalmente en función de la edad gestacional y la edad postnatal, y en menor medida con el peso del recién nacido.

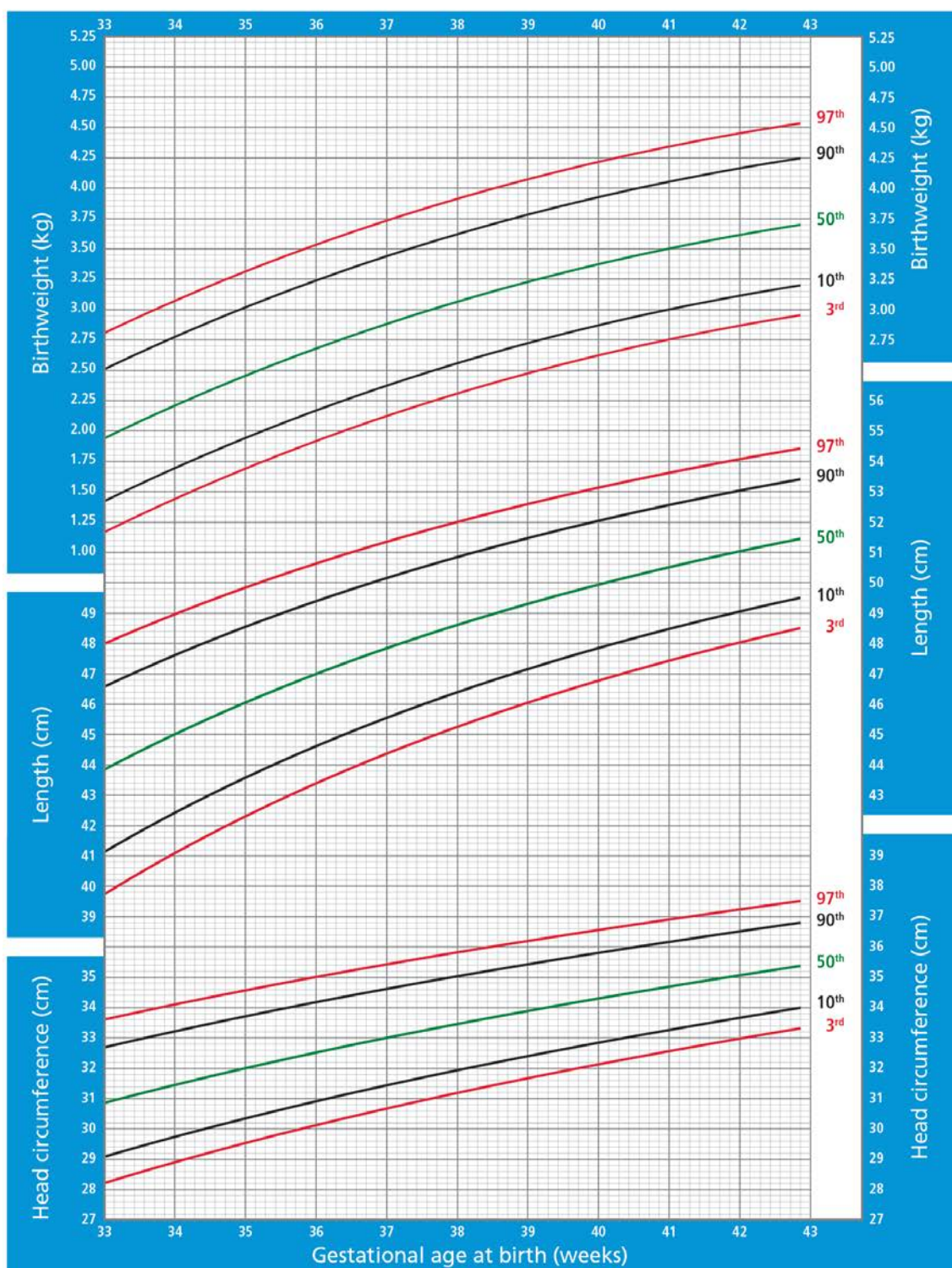
3. Gráficas de crecimiento

En el año 2006, la OMS publicó los Estándares internacionales de crecimiento para los niños menores de 5 años, que ahora son aceptados mundialmente. En su página web (enlace who.int/childgrowth/standards/es) se pueden obtener las gráficas de crecimiento para el peso, la longitud y el PC según el sexo y a diferentes edades hasta los 5 años y expresadas en percentiles o puntuaciones Z. Sin embargo, continuaba faltando la parte fetal y neonatal, por lo que se creó el proyecto *International Fetal and Newborn Growth Consortium for the 21st Century o INTERGROWTH-21st*, formado por numerosos investigadores y clínicos cuyo objetivo fue ampliar los estándares de la OMS para la parte fetal y de RN y establecer herramientas para la continuidad del cuidado desde la concepción hasta los 5 años de edad. Con ello, surgieron las gráficas de crecimiento INTERGROWTH-21 que están expresadas en percentiles para el peso, la longitud y el PC según el sexo y la edad gestacional (desde las 33 a las 43 semanas de edad gestacional) (*Figuras 54 y 55*).





International Standards for Size at Birth (Boys)



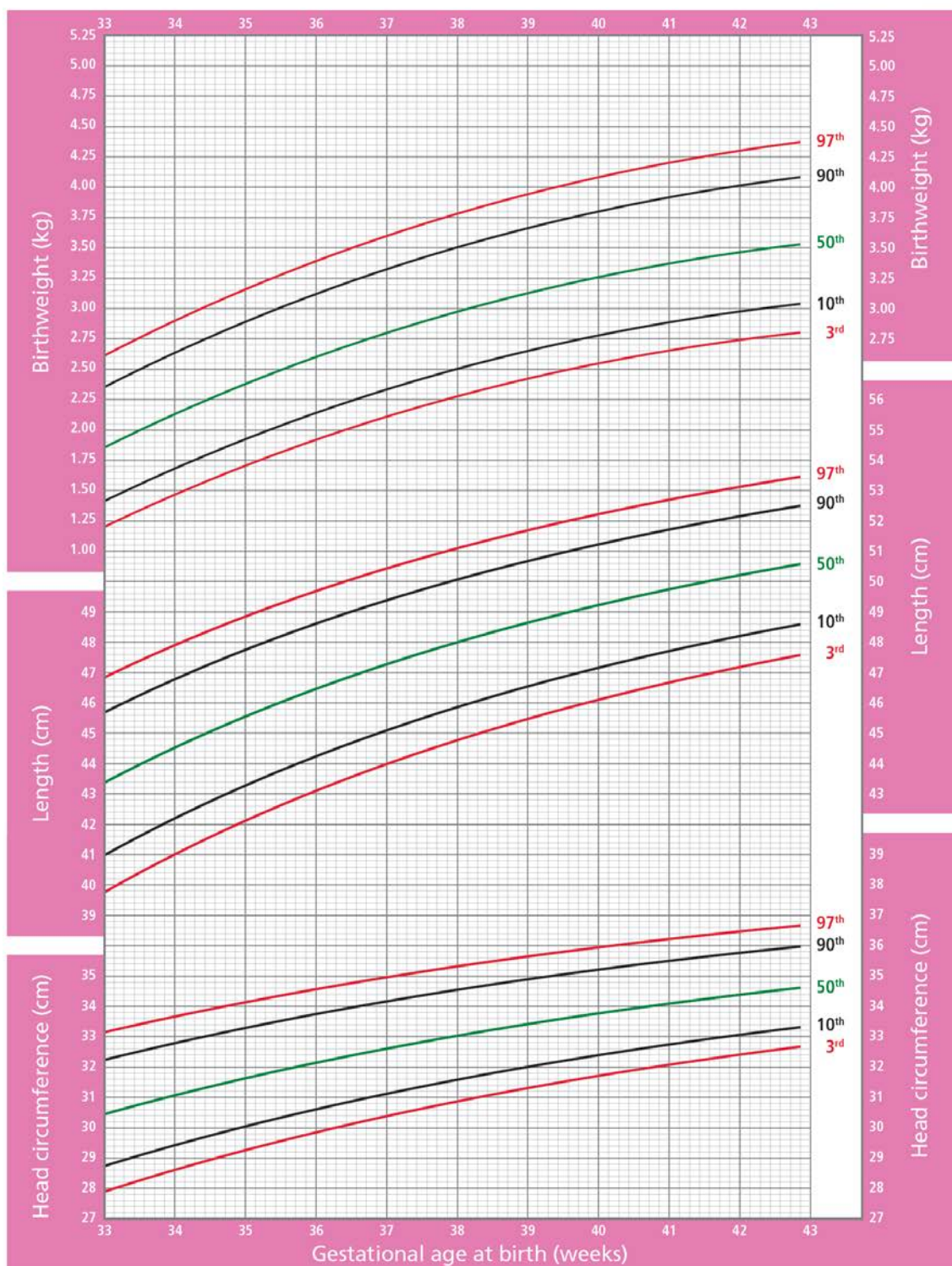
© University of Oxford

Ref: Villar J et al. Lancet 2014; 384: 857-868

Figura 54: Gráfica de crecimiento Intergrowth-21 para niños según la edad gestacional



International Standards for Size at Birth (Girls)



© University of Oxford

Ref: Villar J et al. Lancet 2014; 384: 857-868

Figura 55: Gráfica de crecimiento Intergrowth-21 para niñas según la edad gestacional

4. Autorizaciones

Mail de autorización para el uso de la Figura 23, 31/3/17:

RE: authorization

permissions (US) [permissions@sagepub.com]

Enviado: viernes, 31 de marzo de 2017 17:33

Para: Iglesias Deus, Alicia

Dear Alicia Iglesias Deus,

Thank you for your request. Please consider this email as permission to use the material as detailed below in your upcoming thesis/dissertation. Please note that this permission does not cover any 3rd party material that may be found within the work. You must properly credit the original source, *Journal of Child Neurology*. Please contact us for any further usage of the material, or if you have any questions.

Best wishes,

Craig Myles
Rights Coordinator
SAGE Publishing
2455 Teller Road
Thousand Oaks, CA 91320
USA

www.sagepublishing.com

Los Angeles | London | New Delhi
Singapore | Washington DC



IX. ÍNDICE DE TABLAS





Tabla 1	Conferencia de consenso sobre el diagnóstico de la anoxia intraparto
Tabla 2	Receptores ionotrópicos de glutamato
Tabla 3	Clasificación de la EHI según criterios de Sarnat
Tabla 4	Escala de García-Alix
Tabla 5	Escala modificada de García-Alix, 2008
Tabla 6	Score de Thompson
Tabla 7	Grados de severidad en RM cerebral
Tabla 8	Biomarcadores de daño neurológico y su potencial uso en el daño cerebral neonatal
Tabla 9	Signos clínicos de alarma previos al alta hospitalaria en pacientes con EHI
Tabla 10	Pronóstico de los pacientes con EHI según la localización, extensión y gravedad de las lesiones objetivadas por RM cerebral
Tabla 11	Características del grupo de casos: Sexo, datos somatométricos y edad gestacional
Tabla 12	Características del grupo de casos: Apgar, Fc, T ^a , tipo de parto, indicador de riesgo de hipoxia-isquemia perinatal
Tabla 13	Características del grupo de casos: Necesidad de reanimación, equilibrio ácido-base y láctico
Tabla 14	Características del grupo de casos: Evolución de las concentraciones de láctico al nacimiento, a la hora y a las 24 horas de vida
Tabla 15	Características del grupo de casos: Concentraciones de glutamato, transaminasas y CK en la primera hora de vida
Tabla 16	Características del grupo de casos: Manifestaciones clínicas neurológicas y extraneurológicas en las primeras 48 horas de vida
Tabla 17	Características del grupo de controles: Sexo, datos somatométricos y edad gestacional

- Tabla 18** Características del grupo de controles: Apgar, Fc, T^a, tipo de parto, indicador de riesgo de hipoxia-isquemia perinatal
- Tabla 19** Características del grupo de controles: Necesidad de reanimación, equilibrio ácido-base y láctico
- Tabla 20** Características del grupo de controles: Concentraciones de glutamato, transaminasas y CK en la primera hora de vida
- Tabla 21** Afectación sistémica y mortalidad en acidosis y EHI
- Tabla 22** Descriptiva diferencial de casos y controles y valoración de la significación estadística
- Tabla 23** Relación entre el pH y otras variables de estudio
- Tabla 24** Relación entre el lactato y otras variables de estudio
- Tabla 25** Análisis de glutamato, transaminasas y CK. Comparativa entre casos y controles y significación estadística
- Tabla 26** Relación entre el glutamato y otras variables de estudio
- Tabla 27** Relación entre GOT y otras variables de estudio
- Tabla 28** Relación entre GPT y otras variables de estudio
- Tabla 29** Relación entre la GGT y otras variables de estudio
- Tabla 30** Relación entre la CK y otras variables de estudio
- Tabla 31** Relación entre el Apgar5 y otras variables de estudio
- Tabla 32** Análisis multivariante acidosis perinatal-glutamato
- Tabla 33** Análisis multivariante acidosis perinatal-GOT/ GPT/ GGT/ CK
- Tabla 34** Análisis multivariante glutamato-GOT/ GPT/ GGT/ CK
- Tabla 35** Comparación de pH, glutamato y GOT dentro del grupo de casos
- Tabla 36** Resultados de la escala de desarrollo infantil Bayley III
- Tabla 37** Test de Apgar

X. ÍNDICE DE FIGURAS





- Figura 1** Fisiopatología en hipoxia-isquemia
- Figura 2** Fases en la génesis de la lesión cerebral anóxica
- Figura 3** GOT como enzima limpiadora de glutamato
- Figura 4** Receptores ionotrópicos y metabotrópicos de glutamato
- Figura 5** Neurotoxicidad mediada por glutamato
- Figura 6** EEGa trazado continuo. Ciclos de sueño-vigilia
- Figura 7** EEGa trazado discontinuo
- Figura 8** EEGa continuo de bajo voltaje
- Figura 9** EEGa brote-supresión
- Figura 10** EEGa plano o inactivo
- Figura 11** EEGa actividad paroxística aislada
- Figura 12** EEGa estatus epiléptico
- Figura 13** Ecografía transfontanelar: Datos de edema cerebral
- Figura 14** Ecografía transfontanelar: Encefalomalacia multiquística
- Figura 15** Ecografía doppler: Patrón de hiperemia
- Figura 16** Ecografía doppler: Patrón de isquemia
- Figura 17** Patrones de daño hipóxico-isquémico
- Figura 18** Patrones de daño hipóxico-isquémico en RM cerebral
- Figura 19** Imágenes de RM cerebral. Afectación del BPCI
- Figura 20** Grados de severidad en RM cerebral
- Figura 21** Metabolismo de la glucosa cerebral durante la infancia
- Figura 22** Progresión del daño neurológico en RM convencional y en difusión en el día 1, 3 y 10 en pacientes con EHI en normotermia y tratados con hipotermia
- Figura 23** Comparación entre las rSO₂ cerebrales y sistémicas en las primeras 72 horas de vida en pacientes con EHI tratados con hipotermia y los resultados

a los 18 meses de vida

Figura 24 Resumen de los principales factores pronósticos en EHI

Figura 25 Incidencia afectación neurológica y extraneurológica en los casos

Figura 26 Apgar1 y Apgar5 vs casos/ controles

Figura 27 RCP vs casos/ controles

Figura 28 Bicarbonato y EB vs casos/ controles

Figura 29 Lactato vs casos/ controles

Figura 30 Tipo de parto vs casos/ controles

Figura 31 Indicador de riesgo de hipoxia-isquemia vs casos/ controles

Figura 32 pH vs sexo

Figura 33 pH vs necesidad de reanimación al nacimiento

Figura 34 pH vs puntuaciones Apgar1 y Apgar5

Figura 35 pH vs lactato

Figura 36 Lactato vs sexo

Figura 37 Lactato vs tipo de parto

Figura 38 Lactato vs necesidad de reanimación al nacimiento

Figura 39 Lactato vs Apgar1 y Apgar5

Figura 40 Análisis de transaminasas y CK. Comparativa entre casos y controles y significación estadística

Figura 41 Glutamato vs casos/ controles

Figura 42 GOT vs casos/ controles

Figura 43 Glutamato vs pH

Figura 44 Glutamato vs lactato

Figura 45 Glutamato vs Apgar5

Figura 46 GOT vs tipo de parto

Figura 47 GOT vs pH

Figura 48 GOT vs lactato

Figura 49 GOT vs Apgar5

Figura 50 GOT vs glutamato

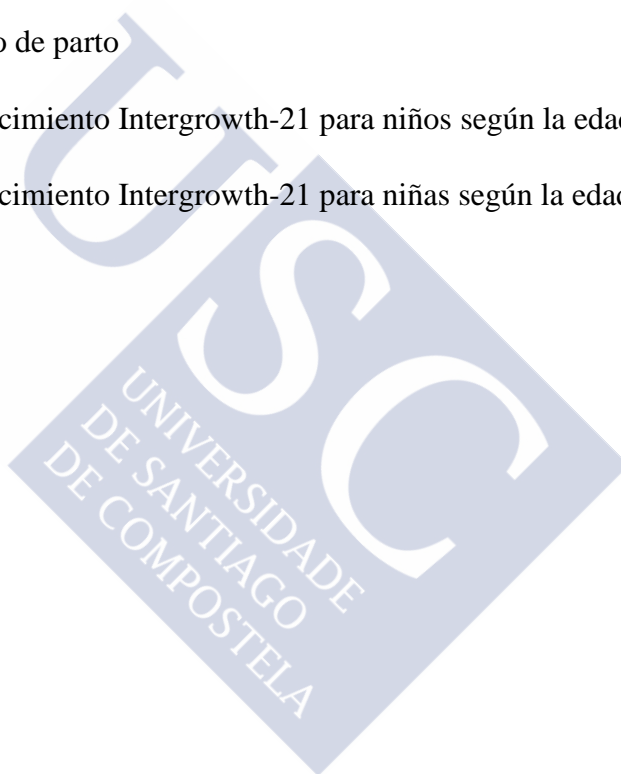
Figura 51 GPT vs pH

Figura 52 Apgar5 vs necesidad de reanimación al nacimiento

Figura 53 Apgar5 vs tipo de parto

Figura 54 Gráfica de crecimiento Intergrowth-21 para niños según la edad gestacional

Figura 55 Gráfica de crecimiento Intergrowth-21 para niñas según la edad gestacional





XI. ABREVIATURAS





ACV	Accidente cerebro vascular
AMPA	Ácido- α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico
Apgar1	Apgar al minuto de vida
Apgar5	Apgar a los 5 minutos de vida
Apgar10	Apgar a los 10 minutos de vida
ATP	Adenosín trifosfato
AVAC	Años de vida ajustados por calidad
AVAD	Años de vida ajustados por discapacidad
BPCI	Brazo posterior de la cápsula interna
CDC	Centro para el control y prevención de enfermedades
CI	Coeficiente de inteligencia
CID	Coagulación intravascular diseminada
CK	Creatina kinasa
CK-BB	Creatincinasa específica del cerebro
CK-MB	Creatina quinasa de origen miocárdico
Cx	Cesárea
Cx Ux	Cesárea urgente
EAATs	Transportadores de aminoácidos excitatorios
EB	Exceso de bases
ECG	Electrocardiograma
EEG	Electroencefalograma
EEGa	Electroencefalograma integrado por amplitud
EHI	Encefalopatía hipóxico-isquémica
EN	Encefalopatía Neonatal
ENE	Enolasa neuronal específica
EPO	Eritropoyetina
EpoR	Receptor de eritropoyetina
ET	Endotraqueal

FAP	Factor activador plaquetario
Fc	Frecuencia cardiaca
FSC	Flujo sanguíneo cerebral
GB	Ganglios de la base
GEG	Peso elevado para la edad gestacional
GGT	Gamma glutamil transpeptidasa
GI	Gastrointestinal
GOT	Transaminasa glutámico-oxaloacética
GPT	Transaminasa glutámico-pirúvica
HIF-1α	Factor inducible por hipoxia 1 α
HUCT-1	Hidrolasa L1 ubiquitina carboxil-terminal
IL	Interleuquina
IL-6	Interleukina-6
IP	Índice de pulsabilidad
IP3	Inositoltrifosfato
IR	Índice de resistencia
IRA	Insuficiencia renal aguda
IT-21	Intergrowth-21
IV	Intravenoso
LCR	Líquido cefalorraquídeo
LPM	Latidos por minuto
M	Mujer
MgSO₄	Sulfato de magnesio
μV	Microvoltios
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido de hidrógeno
NIRS	Near Infrared Spectroscopy
NMDA	N-metil-D-aspartato
NO	Óxido nítrico
OMS	Organización mundial de la salud

ONOO-	Peroxinitrito
p	Percentil
PC	Perímetro de cráneo
PEATC	Potenciales evocados auditivos del tronco cerebral
PEG	Pequeño para la edad gestacional
PET	Tomografía de emisión de positrones
PEV	Parto eutócico de vértice
PEVi	Potenciales evocados visuales
PFAG	Proteína fibrilar ácida de la glía
PG	Prostaglandina
PI	Parto instrumentalizado
PIC	Presión intracraneal
PPC	Presión de perfusión cerebral
RCP	Reanimación cardiopulmonar
rGOT	GOT recombinante
RM	Resonancia magnética
RN	Recién nacido
RP	Reanimación profunda
RS	Reanimación superficial
rSO₂	Saturación regional de oxígeno
s	Semanas
SNC	Sistema nervioso central
SPBF	Sospecha de pérdida del bienestar fetal
SSF	Suero salino fisiológico
T^a	Temperatura
TA	Tensión arterial
TEA	Trastorno del espectro autista
TNF	Factor de necrosis tumoral
V	Varón

V_m	Velocidad media
VPN	Valor predictivo negativo
VPPI	Ventilación con presión positiva intermitente
VVP	Valor predictivo positivo



XII.BIBLIOGRAFÍA





1. **Martínez-Biarge M, Díez-Sebastián J, Wusthoff CJ, Mercuri E, Cowan FM.** Antepartum and intrapartum factors preceding neonatal hypoxic-Ischemic encephalopathy. *Pediatrics* 2013; 132: e952-59.
2. **MacLennan A.** A template for defining a causal relation between acute intrapartum events and cerebral palsy: international consensus statement. *BMJ* 1999; 319:1054-59.
3. **Committee on Fetus and Newborn, American Academy of Pediatrics, and Committee on Obstetric practice, American College of Obstetricians and Gynecologists.** Use and abuse of the Apgar score. *Pediatrics* 1996; 98:141-42.
4. **Hankins GD, Speer M.** Defining the pathogenesis and pathophysiology of neonatal encephalopathy and cerebral palsy. *Obstet Gynecol* 2003; 102:628-36.
5. **Marret S, Jadas V, Kieffer A, Chollat C, Rondeau S, Chadie A.** Treatment of encephalopathy by hypothermia in the term newborn. *Arch Pediatr* 2014; 21:1026-34.
6. **Bax M, Tydeman C, Flodmark O.** Clinical and MRI correlates of cerebral palsy: the European Cerebral Palsy Study. *JAMA* 2006; 296:1602-8.
7. **Blanco D, García-Alix A, Valverde E, Tenorio V, Vento M, Cabañas F;** Comisión de Estándares de la Sociedad Española de Neonatología (SEN). Neuroprotección with hypothermia in the newborn with hypoxic-ischaemic encephalopathy. Standard guidelines for its clinical application. *An Pediatr (Barc)* 2011; 75:341.e1-20.
8. **Arnaez J, Vega C, García-Alix A, Gutiérrez EP, Caserío S, Jiménez MP et al.** Multicenter program for the integrated care of newborns with perinatal hypoxic-ischemic insult (ARAHIP). *An Pediatr (Barc)* 2015; 82: 172-82.
9. **Liu F, McCullough LD.** Inflammatory responses in hypoxic ischemic encephalopathy. *Acta Pharmacol Sin* 2013; 34:1121-30.
10. **Boskabadi H, Ashrafzadeh F, Doosti H, Zakerihamidi M.** Assessment of Risk Factors and Prognosis in Asphyxiated Infants. *Iran J Pediatr* 2015; 25(4): e2006.

11. **Thompson DK, Wood SJ, Doyle LW, Warfield SK, Lodygensky GA, Anderson PJ et al.** Neonate hippocampal volumes: prematurity, perinatal predictors, and 2-year outcome. *Ann Neurol* 2008; 63: 642-51.
12. **Lee AC, Kozuki N, Blencowe H, Vos T, Bahalim A, Darmstadt GL et al.** Intrapartum-related neonatal encephalopathy incidence and impairment at regional and global levels for 2010 with trends from 1990. *Pediatr Res* 2013; 74 Suppl 1:50-72.
13. **Hull J, Dodd KL.** Falling incidence of hypoxic-ischaemic encephalopathy in term infants. *Br J Obstet Gynaecol* 1992; 99: 386-91.
14. **Smith J, Wells L, Dodd K.** The continuing fall in incidence of hypoxic-ischaemic encephalopathy in term infants. *BJOG*. 2000; 107: 461-66.
15. **Becher JC, Stenson BJ, Lyon AJ.** Is intrapartum asphyxia preventable? *BJOG* 2007; 114: 1442-44.
16. **Thornberg E, Thiringer K, Odeback A, Milsom I.** Birth asphyxia: incidence, clinical course and outcome in a Swedish population. *Acta Paediatr* 1995; 84: 927-32.
17. **Levene MI, Kornberg J, Williams TH.** The incidence and severity of postasphyxia encephalopathy in full-term infants. *Early Hum Dev* 1985; 11: 21-26.
18. **González de Dios J, Moya M, Vioque J.** Factores de riesgo predictivos de secuelas neurológicas en recién nacidos a término con asfixia perinatal. *Rev Neurol* 2001; 32: 201-06.
19. **Esqué MT, Baraibar R, Figueras J, Maurí E, Moretones MG, Padula C et al.** Estudio multicéntrico sobre asfixia neonatal. *An Esp Pediatr* 1985; 23: 542-50.
20. **Kurinczuk JJ, White-Koning M, Badawi N.** Epidemiology of neonatal encephalopathy and hypoxic-ischaemic encephalopathy. *Early Hum Dev* 2010; 86: 329-38.

21. **García-Alix A, Martínez Biarge M.** Incidencia y Prevalencia de la encefalopatía hipóxico-isquémica (EHI) perinatal: necesidad de regionalizar y centralizar los programas de hipotermia moderada sostenida en el recién nacido con EHI. *An Pediatr* 2009; 71: 319-26.
22. **Tenorio V, Alarcón A, García-Alix A, Arca G, Camprubí M, Agut T et al.** Hipotermia cerebral moderada en la encefalopatía hipóxico-isquémica. Experiencia en el primer año de su puesta en marcha. *An Pediatr* 2012; 77(2): 88-97.
23. **Uria-Avellanal C, Robertson NJ.** Na⁺/H⁺ exchangers and intracellular pH in perinatal brain injury. *Transl Stroke Res* 2014; 5:79-98.
24. **Gluckman PD, Williams CE.** When and why do brain cells die? *Dev Med Child Neurol* 1992; 34:1010-14.
25. **Lipton SA, Rosenberg PA.** Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *N Engl J Med* 1994; 330:613-22.
26. **Hassell KJ, Ezzati M, Alonso-Alconada D, Hausenloy DJ, Robertson NJ.** New horizons for newborn brain protection: enhancing endogenous neuroprotection. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2015; 100:F541-52.
27. **Martínez Orgado J, Pazos Rodríguez MR, Martín Ancel A.** Encefalopatía hipóxico-isquémica neonatal. En Verdú Perez A, Sociedad Española de Neurología et al, edits. *Manual de Neurología Infantil*. Ed. Médica Panamericana, Madrid, 2014: 141-150.
28. **Luyt K, Váradi A, Durant CF, Molnár E.** Oligodendroglial metabotropic glutamate receptors are developmentally regulated and involved in the prevention of apoptosis. *J Neurochem* 2006; 99: 641-56.
29. **Smith QR.** Transport of glutamate and other amino acids at the blood-brain barrier. *J Nutr* 2000; 130:1016S-22S.
30. **Hawkins RA.** The blood-brain barrier and glutamate. *Am J Clin Nutr* 2009; 90: 867S-874S.

31. **Pu Y, Li QF, Zeng CM, Gao J, Qi J, Luo DX.** Increased detectability of alpha brain glutamate/glutamine in neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *AJNR Am J Neuroradiol* 2000; 21: 203-12.
32. **Boyko M, Gruenbaum SE, Gruenbaum BF, Shapira Y, Zlotnik A.** Brain to blood glutamate scavenging as a novel therapeutic modality: a review. *J Neural Transm* 2014; 121: 971-79.
33. **O’Kane RL, Martínez-López I, DeJoseph MR, Viña JR, Hawkins RA.** Na⁺-dependent glutamate transporters (EAAT1, EAAT2, and EAAT3) of the blood-brain barrier: A mechanism for glutamate removal. *J Biol Chem* 1999; 274: 31891-95.
34. **Rivera-Cervantes MC, Flores-Soto ME, Chaparro-Huerta V, Reyes-Gómez J, Feria-Velasco A, Schliebs R.** Changes in hippocampal NMDA-R subunit composition induced by exposure of neonatal rats to L-glutamate. *Int J Dev Neurosci.* 2009; 27:197-204.
35. **Tang XJ, Xing F.** Calcium permeable AMPA receptors in neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy (Review). *Biomed Rep* 2013; 1: 828-32.
36. **Lipton P.** Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol Rev* 1999; 79: 1431–568.
37. **Zauner A, Bullock R, Kuta AJ, Woodward J, Young HF.** Glutamate release and cerebral blood flow after severe human head injury. *Acta Neurochir* 1996 Suppl 67:40–44.
38. **Castillo J, Davalos A, Naveiro J, Noya M.** Neuroexcitatory amino acids and their relation to infarct size and neurological deficit in ischemic stroke. *Stroke* 1996; 27:1060–1065.
39. **Castillo J, Davalos A, Noya M.** Progression of ischaemic stroke and excitotoxic aminoacids. *Lancet* 1997; 349:79–83.
40. **Johnston MV, Trescher WH, Ishida A, Nakajima W.** Neurobiology of hypoxic-ischemic injury in the developing brain. *Pediatr Res* 2001; 49:735–41.

41. **Shaw PJ, Forrest V, Ince PG, Richardson JP, Wastell HJ.** CSF and plasma amino acid levels in motor neuron disease: elevation of CSF glutamate in a subset of patients. *Neurodegeneration* 1995; 4: 209-16.
42. **Spranger M, Krempien S, Schwab S, Maiwald M, Bruno K, Hacke W.** Excess glutamate in the cerebrospinal fluid in bacterial meningitis. *J Neurol Sci* 1996; 143: 126-31.
43. **Ferrarese C, Aliprandi A, Tremolizzo L, Stanzani L, De Micheli A, Dolara A.** Increased glutamate in CSF and plasma of patients with HIV dementia. *Neurology* 2001; 57: 671-75.
44. **Amiel-Tison C, Ellison P.** Birth asphyxia in the full-term newborn: Early assessment and outcome. *Dev Med Child Neurol* 1986; 28: 671-82.
45. **Sarnat HB, Sarnat MS.** Neonatal encephalopathy following fetal distress: a clinical and electroencephalographic study. *Arch Neurol* 1976; 33: 698-705.
46. **García-Alix A, Cabañas F, Pellicer A, Hernanz A, Stiris TA, Quero J.** Neuronspecific enolase and myelin basic protein: relationship of cerebrospinal fluid concentrations to the neurologic condition of asphyxiated full-term infants. *Pediatrics* 1994; 93: 234-40.
47. **Miller SP, Latal B, Clark H, Barnwell A, Glidden D, Barkovich AJ et al.** Clinical signs predict 30-month neurodevelopmental outcome after neonatal encephalopathy. *Am J Obstet Gynecol* 2004; 190: 93-99.
48. **Thompson CM, Puterman AS, Linley LL, Hann FM, van der Elst CW, Molteno CD et al.** The value of a scoring system for hypoxic ischaemic encephalopathy in predicting neurodevelopmental outcome. *Acta Paediatr* 1997; 86: 757-61.
49. **Biselele T, Naulaers G, Tady B.** Evolution of the Thompson score during the first 6 h in infants with perinatal asphyxia. *Acta Paediatr.* 2014; 103: 145-48.

50. **Roca González AM, López Santiveri A, de la Rosa de los Ríos C, Rodríguez Miguélez JM, Figueras Aloy J, Jiménez González R.** Non-neurologic manifestations in hypoxic-ischemic disease in newborn infants *An Esp Pediatr.* 1992; 36:201-3.
51. **Perlman JM.** Systemic abnormalities in Term infants following perinatal asphyxia. *Clin Perinatol* 1988; 16: 475-84.
52. **Aggarwal A, Kumar P, Chowdhary G, Majumdar S, Narang A.** Evaluation of renal functions in asphyxiated newborns. *J Trop Pediatr* 2005; 51: 295-99.
53. **Gupta BD, Sharma P, Bagla K, Parakh M, Soni JP.** Renal failure in asphyxiated neonates. *Indian Pediatr* 2005; 42:928-34.
54. **Alaro D, Bashir A, Musoke R, Wanaiana L.** Prevalence and outcomes of acute kidney injury in term neonates with perinatal asphyxia *Afr Health Sci* 2014; 14(3):682-88.
55. **Agras PI, Tarcan A, Baskin E, Cengiz N, Gürakan B, Saatci U.** Acute renal failure in the neonatal period. *Ren Fail* 2004; 26:305-9.
56. **Gleason CA, Devaskar SU, Avery ME.** Avery's diseases of the newborn. 9th ed. Philadelphia. PA: Elsevier/ Saunders, 2012.
57. **Gouyon JB, Guignard JP.** Management of acute renal failure in newborns. *Pediatr Nephrol* 2000; 14:1037-44.
58. **Sweetman DU, Riordan M, Molloy EJ.** Management of renal dysfunction following term perinatal hypoxia-ischaemia. *Acta Paediatr.* 2013; 102:233-41.
59. **Chhavi N, Zutshi K, Singh NK, Awasthi A, Goel A.** Serum liver enzyme pattern in birth asphyxia associated liver injury. *Pediatr Gastroenterol Hepatol Nutr* 2014; 17: 162-69.
60. **Guía de práctica clínica sobre encefalopatía hipóxico-isquémica perinatal en el recién nacido.** Guía de práctica clínica en el SNS. 2015.

61. **Toso PA, González AJ, Pérez ME, Kattan J Fabres JG, Tapia JL et al.** Clinical utility of early amplitude integrated EEG in monitoring term newborns at risk of neurological injury. *J Pediatr (Rio J)*. 2014; 90:143-48.
62. **Dinan D, Daneman A, Guimaraes CV, Chauvin NA, Victoria T, Epelman M.** Easily overlooked sonographic findings in the evaluation of neonatal encephalopathy: lessons learned from magnetic resonance imaging. *Semin Ultrasound CT MR* 2014; 35:627-51.
63. **Levene MI, Fenton AC, Evans DH, Archer LN, Shortland DB, Gibson NA.** Severe birth asphyxia and abnormal cerebral blood-flow velocity. *Dev Med Child Neurol*. 1989; 31: 427-34.
64. **Eken P, Toet MC, Groenendaal F, de Vries LS.** Predictive value of early neuroimaging, pulsed Doppler and neurophysiology in full term infants with hypoxic-ischaemic encephalopathy. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 1995; 73: F75-80.
65. **Bax M, Tydeman C, Flodmark O.** Clinical and MRI correlates of cerebral palsy: the European Cerebral Palsy Study. *JAMA* 2006; 296:1602–8.
66. **Chao CP, Zaleski CG, Patton AC.** Neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy: multimodality imaging findings. *Radiographics* 2006;26 Suppl 1: S159–72.
67. **Chau V, Poskitt KJ, Miller SP.** Advanced neuroimaging techniques for the term newborn with encephalopathy. *Pediatr Neurol* 2009; 40:181–88.
68. **Rutherford M, Srinivasan L, Dyet L, Ward P, Allsop J, Counsell S et al.** Magnetic resonance imaging in perinatal brain injury: clinical presentation, lesions and outcome. *Pediatr Radiol* 2006; 36: 582–92.
69. **Badve CA, Khanna PC, Ishak GE.** Neonatal ischemic brain injury: what every radiologist needs to know. *Pediatr Radiol* 2012; 42: 606-19.
70. **Okereafor A, Allsop J, Counsell SJ, Fitzpatrick J, Azzopardi D, Rutherford MA et al.** Patterns of brain injury in neonates exposed to perinatal sentinel events. *Pediatrics* 2008; 121: 906-14.

71. **Kannan S, Chugani HT.** Applications of positron emission tomography in the newborn nursery. *Semin Perinatol* 2010; 34:39-45.
72. **Kerrigan JF, Chugani HT, Phelps ME.** Regional cerebral glucose metabolism in clinical subtypes of cerebral palsy. *Pediatr Neurol* 1991; 7:415–25.
73. **Douglas-Escobar M, Weiss MD.** Biomarkers of hypoxic-ischemic encephalopathy in newborns. *Front Neurol* 2012; 3: 144.
74. **Gazzolo D, Abella R, Frigiola A, Giamberti A, Tina G, Nigro F et al.** Neuromarkers and unconventional biological fluids. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2010; 23 Suppl 3: 66–9.
75. **Gazzolo D, Marinoni E, Di Iorio R, Bruschettini M, Kornacka M, Lituanica M et al.** Urinary S100B protein measurements: a tool for the early identification of hypoxic-ischemic encephalopathy in asphyxiated full-term infants. *Crit Care Med* 2004; 32: 131–36.
76. **Qian J, Zhou D, Wang YW.** Umbilical artery blood S100beta protein: a tool for the early identification of neonatal hypoxic- ischemic encephalopathy. *Eur J Pediatr* 2009; 168, 71–77.
77. **Ennen CS, Huisman TA, Savage WJ, Northington FJ, Jennings JM, Everett AD et al.** Glial fibrillary acidic protein as a biomarker for neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy treated with whole-body cooling. *Am J Obstet Gynecol* 2011; 205: 251.e1–7.
78. **Chalak LF, Sánchez PJ, Adams-Huet B, Laptook AR, Heyne RJ, Rosenfeld CR.** Biomarkers for severity of neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy and outcomes in newborns receiving hypothermia therapy. *J Pediatr* 2014; 164: 468-74.
79. **Karlsson M, Blennow M, Nemeth A, Winblad B.** Dynamics of hepatic enzyme activity following birth asphyxia. *Acta Pediatr* 2006; 95: 1405-11.
80. **England K, Thorne C, Pembrey L, Tovo PA, Newell ML.** Age and Sex related reference ranges of alanine aminotransferase levels in children: European Paediatric HCV Network. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2009; 49:71-77.

81. **Soldin SJ, Savvoir TV, Guo Y.** Pediatric reference ranges for gamma-glutamyltransferase and urea nitrogen during the first year of life on the Vitros 500 analyzer. *Clin Chem* 1997; 43: S199.
82. **Shellhaas RA, Kushwaha JS, Plegue MA, Selewski DT, Barks JD.** An evaluation of cerebral and systemic predictors of 18-month outcomes for neonates with hypoxic ischemic encephalopathy. *J Child Neurol* 2015; 30: 1526-31.
83. **Aggarwal A, Kumar P, Chowdhary G, Majumdar S, Narang A.** Evaluation of renal functions in asphyxiated newborns. *J Trop Pediatr.* 2005; 51:295–99.
84. **Karlowicz M, Adelman R.** Nonoliguric and oliguric acute renal failure in asphyxiated term neonates. *Pediatr Nephrol* 1995; 9:718–22.
85. **Kaur S, Jain S.** Evaluation of glomerular and tubular renal function in neonates with birth asphyxia. *Ann Trop Paediatr* 2011; 31:129–34.
86. **Alaro D, Bashir A, Musoke R, Wanaiana L.** Prevalence and outcomes of acute kidney injury in term neonates with perinatal asphyxia. *Afr Health Sci* 2014; 14: 682-88.
87. **Ayling RM, Bowron A.** Neonatal biochemical reference ranges. In: Rennie JM, editor. *Rennie & Robertson's Textbook of Neonatology*. 5th ed. Churchill Livingstone, London, 1309-1317, 2012.
88. **Adams JE, Bodor GS, Dávila-Román VG, Delmez JA, Apple FS, Ladenson et al.** Cardiac troponin-I: A marker with high specificity for cardiac injury. *Circulation* 1993; 88:101-6.
89. **Boo NY, Hafidz H, Nawawi HM, Cheah FC, Fadzil YJ, Abdul-Aziz BB et al.** Comparison of serum cardiac troponin T and creatin kinase MB isoenzyme mass concentrations in asphyxiated term infants during the first 48 hours of life. *J Paediatr Child Health* 2005; 41:331-37.
90. **Sweetman D, Armstrong K, Murphy JF, Molloy EJ.** Cardiac biomarkers in neonatal hypoxic ischaemia. *Acta Paediatr* 2012; 101: 338-43.
91. **Ottinger D, Nash P.** Troponin. *Neonatal Netw* 2013; 32:365-68.

92. **Shastri AT, Samarasekara S, Muniraman H, Clarke P.** Cardiac troponin I concentrations in neonates with hypoxic-ischaemic encephalopathy. *Acta Paediatr* 2012; 101: 26-29.
93. **Türker G, Babaoğlu K, Duman C, Gökalp A, Zengin E, Arisoy AE.** The effect of blood gas and Apgar score on cord blood cardiac troponin I. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2004; 16:315-19.
94. **Trevisanuto D, Picco G, Golin R, Doglioni N, Altinier S, Zaninotto M et al.** Cardiac Troponin I in asphyxiated neonates. *Biol Neonate* 2006; 89:190-93.
95. **Wintermark P, Hansen A, Warfield SK, Dukhovny D, Soul JS.** Near-infrared spectroscopy versus magnetic resonance imaging to study brain perfusion in newborns with hypoxic-ischemic encephalopathy treated with hypothermia. *Neuroimage* 2014; 85 Pt1: 287-93.
96. **Shellhaas RA, Thelen BJ, Bapuraj JR, Burns JW, Swenson AW, Christensen MK et al.** Limited short-term prognostic utility of cerebral NIRS during neonatal therapeutic hypothermia. *Neurology* 2013; 81: 249-55.
97. **Shankaran S, Laptook AR, Pappas A, McDonald SA, Das A, Tyson JE, et al.** Effect of depth and duration of cooling on deaths in the NICU among neonates with hypoxic ischemic encephalopathy: a randomized clinical trial. *JAMA* 2014; 312: 2629-39.
98. **Committee on fetus and newborn, Papile LA, Baley JE, Cummings J, Carlo WA, Eichenwald E, et al.** Hypothermia and neonatal encephalopathy. *Pediatrics* 2014; 133: 1146-50.
99. **Gluckman PD, Wyatt JS, Azzopardi D, Ballard R, Edwards AD, Ferriero DM, et al.** Selective head cooling with mild systemic hypothermia after neonatal encephalopathy: multicentre randomised trial. *Lancet* 2005; 365: 663-70.
100. **Shankaran S, Laptook AR, Ehrenkranz RA, Tyson JE, McDonald SA, Donovan EF et al.** Whole-body hypothermia for neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy. *New Engl J Med* 2005; 353: 1574-84.

101. **Azzopardi DV, Strohm B, Edwards AD, Dyet L, Halliday HL, Juszczak E et al.** TOBY Study Group. Moderate hypothermia to treat perinatal asphyxial encephalopathy. *N Engl J Med* 2009; 361: 1349-58.
102. **Edwards AD, Azzopardi DV.** Therapeutic hypothermia following perinatal asphyxia. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* e2006; 91: F127-31.
103. **Schulzke SM, Rao S, Patole SK.** A systematic review of cooling for neuroprotection in neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy- are we there yet? *BMC Pediatr* 2007; 7: 30.
104. **Shah PS, Ohlsson A, Perlman M.** Hypothermia to treat neonatal hypoxic ischemic encephalopathy: systematic review. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2007; 161: 951-8.
105. **Jacobs S, Hunt R, Tarnow-Mordi W, Inder T, Davis P.** Cooling for newborns with hypoxic ischaemic encephalopathy. *Cochrane Database Syst Rev* 2007; 4:CD00311.
106. **Shah PS.** Hypothermia: a systematic review and meta-analysis of clinical trials. *Semin Fetal Neonatal Med* 2010; 15: 238-46.
107. **Eicher DJ, Wagner CL, Katikaneni LP, Hulsey TC, Bass WT, Kaufman DA et al.** Moderate hypothermia in neonatal encephalopathy: safety outcomes. *Pediatr Neurol* 2005; 32: 18-24.
108. **García-Alix A, González de Dios J.** La encefalopatía hipóxico-isquémica en el recién nacido a término ha dejado de ser una entidad huérfana. Implicaciones para la práctica y necesidad de un “código hipotermia”. *Evid Pediatr* 2010; 6: 27.
109. **Edwards AD, Brocklehurst P, Gunn AJ, Halliday H, Juszczak E, Levene M et al.** Neurological outcomes at 18 months of age after moderate hypothermia for perinatal hypoxic ischaemic encephalopathy: synthesis and meta-analysis of trial data. *BMJ* 2010; 340: c363.

110. **Rutherford M, Ramenghi LA, Edwards AD, Brocklehurst P, Halliday H, Levene M et al.** Assessment of brain tissue injury after moderate hypothermia in neonates with hypoxic-ischaemic encephalopathy: a nested substudy of a randomised controlled trial. *Lancet Neurol* 2010; 9: 39-45.
111. **Shankaran S, Barnes PD, Hintz SR, Laptook AR, Zaterka-Baxter KM, McDonald SA et al.** Brain injury following trial of hypothermia for neonatal hypoxic-ischaemic encephalopathy. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2012; 97: F398-404.
112. **Gano D, Chau V, Poskitt KJ, Hill A, Roland E, Brant R et al.** Evolution of pattern of injury and quantitative MRI on days 1 and 3 in term newborns with hypoxic-ischemic encephalopathy. *Pediatr Res* 2013; 74:82-87.
113. **Jacobs SE, Morley CJ, Inder TE, Stewart MJ, Smith KR, McNamara PJ et al.** Infant Cooling Evaluation Collaboration. Whole-body hypothermia for term and near-term newborns with hypoxic-ischemic encephalopathy: a randomized controlled trial. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2011; 165: 692–700.
114. **Simbruner G, Mittal RA, Rohlmann F, Muche R, neo.nEURO.network trial participants.** Systemic hypothermia after neonatal encephalopathy: outcomes of neo-.nEURO.network RCT. *Pediatrics* 2010; 126:e771–78.
115. **Tagin MA, Woolcott CG, Vincer MJ, Whyte RK, Stinson DA.** Hypothermia for neonatal hypoxic ischemic encephalopathy: an updated systematic review and meta-analysis. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2012; 166:558–66.
116. **Chevallier M, Ego A, Cans C, Debillon T.** Adherence to hypothermia guidelines: a French multicenter study of fullterm neonates. *PLoS One* 2013; 8:e83742.
117. **Groenendaal F, Casaer A, Dijkman KP, Gavilanes AW, de Haan TR, ter Horst HJ et al.** Introduction of hypothermia for neonates with perinatal asphyxia in the Netherlands and Flanders. *Neonatology* 2013; 104:15–21.

118. **Gonzalez de Dios J.** Definición de asfixia perinatal en la bibliografía médica: necesidad de un consenso. *Rev Neurol* 2002; 35: 628-34.
119. **Spitzmiller RE, Phillips T, Meinzen-Derr J, Hoath SB.** Amplitude-integrated EEG is useful in predicting neurodevelopmental outcome in full-term infants with hypoxic-ischemic encephalopathy: a meta-analysis. *J Child Neurol* 2007; 22: 1069-78.
120. **Gunn AJ, Wyatt JS, Whitelaw A, Barks J, Azzopardi D, Ballard R et al; CoolCap Study Group.** Therapeutic hypothermia changes the prognostic value of clinical evaluation of neonatal encephalopathy. *J Pediatr* 2008; 152: 55-58.
121. **Gadian DG, Aicardi J, Watkins KE, Porter DA, Mishkin M, Vargha-Khadem F.** Developmental amnesia associated with early hypoxi-ischemic injury. *Brain* 2000; 123: 499-507.
122. **van Handel M, de Sonnevile L, de Vries LS, Jongmans MJ, Swaab H.** Specific memory impairment following neonatal encephalopathy in term-born children. *Dev Neuropsychology* 2012; 37: 30-50.
123. **Merchant N, Azzopardi D.** Early predictors of outcome in infants treated with hypothermia for hypoxic-ischaemic encephalopathy. *Dev Med Child Neurol* 2005; 57 Suppl 3: 8-16.
124. **Csekő AJ, Bangó M, Lakatos P, Kárdási J, Pusztai L, Szabó M.** Accuracy of amplitude-integrated electroencephalography in the prediction of neurodevelopmental outcome in asphyxiated infants receiving hypothermia treatment. *Acta Paediatr* 2013; 102: 707-11.
125. **Thoresen M, Hellström-Westas L, Liu X, de Vries LS.** Effect of hypothermia on amplitude-integrated electroencephalogram in infants with asphyxia. *Pediatrics* 2010; 126: e131-9.
126. **Hallberg B, Grossmann K, Bartocci M, Blennow M.** The prognostic value of early aEEG in asphyxiated infants undergoing systemic hypothermia treatment. *Acta Paediatr* 2010; 99: 531-6.

127. **van Laerhoven H, de Haan TR, Offringa M, Post B.** Prognostic tests in term neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy: a systematic review. *Pediatrics* 2013; 131: 88-98.
128. **Wijdicks EF, Hijdra A, Young GB, Bassetti CL, Wiebe S;** Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. Practice parameter: Prediction of outcome in comatose survivors after cardiopulmonary resuscitation (an evidence-based review): Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology; Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology* 2006; 67: 203-10.
129. **Amantini A, Amadori A, Fossi S.** Evoked potentials in the ICU. *Eur J Anaesthesiol Suppl* 2008; 42: 196-202.
130. **Taylor MJ, Murphy WJ, Whyte HE.** Prognostic reliability of somatosensory and visual evoked potentials of asphyxiated term infants. *Dev Med Child Neurol* 1992; 34: 507-15.
131. **Scalais E, François-Adant A, Nuttin C, Bachy A, Guérit JM.** Multimodality evoked potentials as a prognostic tool in term asphyxiated newborns. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1998; 108: 199-207.
132. **Suppiej A.** Role of evoked potentials in neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy: Review of the literatura. *Ann Isg Super Sanita* 2001; 37: 515-525.
133. **Trollmann R, Nüsken E, Wenzel D.** Neonatal somatosensory evoked potentials: Maturational aspects and prognostic value. Elsevier 2010, pp. 427-33.
134. **Lori S, Bertini G, Molesti E, Gualandi D, Gabbanini S, Bastianelli ME et al.** The prognostic role of evoked potentials in neonatal hypoxic-ischemic insult. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2011; 24 Suppl 1: 69-71.
135. **Elstad M, Whitelaw A, Thoresen M.** Cerebral Resistance Index is less predictive in hypothermic encephalopathic newborns. *Acta Paediatr* 2011; 100: 1344-49.

136. **Kudrevičienė A, Basevičius A, Lukoševičius S, Laurynaitienė J, Marmienė V, Nedzelskienė I et al.** The value of ultrasonography and Doppler sonography in prognosticating long-term outcomes among full-term newborns with perinatal asphyxia. *Medicina (Kaunas)* 2014; 50: 100-10.
137. **Miller SP, Ramaswamy V, Michelson D, Barkovich AJ, Holshouser B, Wycliffe N et al.** Patterns of brain injury in term neonatal encephalopathy. *J Pediatr* 2005; 146:453.
138. **Inder TE, Hunt RW, Morley CJ, Coleman L, Stewart M, Doyle LW et al.** Randomized trial of systemic hypothermia selectively protects the cortex on MRI in term hypoxic-ischemic encephalopathy. *J Pediatr* 2004; 145:835-37.
139. **Azzopardi D, Edwards AD.** Magnetic resonance biomarkers of neuroprotective effects in infants with hypoxic ischemic encephalopathy. *Semin Fetal Neonatal Med* 2010; 15:261-69.
140. **Rutherford MA, Pennock JM, Counsell SJ, Mercuri E, Cowan FM, Dubowitz LM et al.** Abnormal magnetic resonance signal in the internal capsule predicts poor neurodevelopmental outcome in infants with hypoxic-ischemic encephalopathy. *Pediatrics* 1998; 102:323-28.
141. **Celtik C, Acunaş B, Oner N, Pala O.** Neuron-specific enolase as a marker of the severity and outcome of hypoxic ischemic encephalopathy. *Brain Dev* 2005; 26: 398–402.
142. **Qian J, Zhou D, Wang YW.** Umbilical artery blood S100beta protein: a tool for the early identification of neonatal hypoxic- ischemic encephalopathy. *Eur J Pediatr* 2009; 168: 71–77.
143. **Gazzolo D, Frigiola A, Bashir M, Iskander I, Mufeed H, Aboulgar H et al.** Diagnostic accuracy of S100B urinary testing at birth in full-term asphyxiated newborns to predict neonatal death. *PLoS ONE* 2009; 4: e4298.
144. **Risso FM, Serpero LD, Zimmermann LJ, Gavilanes AW, Frulio R, Michetti F et al.** Perinatal asphyxia: kidney failure does not affect S100B urine concentrations. *Clin Chim Acta* 2012; 413: 150–53.

145. **Ennen CS, Huisman TA, Savage WJ, Northington FJ, Jennings JM, Everett AD et al.** Glial fibrillary acidic protein as a biomarker for neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy treated with whole-body cooling. *Am J Obstet Gynecol* 2011; 205:251.e1-7.
146. **Massaro AN, Jeromin A, Kadom N, Vezina G, Hayes RL, Wang KK et al.** Serum biomarkers of MRI brain injury in neonatal hypoxic ischemic encephalopathy treated with whole-body hypothermia: a pilot study. *Pediatr Crit Care Med* 2013; 14: 310-17.
147. **Merchant N, Azzopardi D.** Early predictors of outcome in infants treated with hypothermia for hypoxic-ischaemic encephalopathy. *Dev Med Child Neurol* 2015; 57 Suppl 3: 8-16.
148. **Shankaran S, Pappas A, McDonald SA, Vohr BR, Hintz SR, Yoltan K et al;** Eunice Kennedy Shriver NICHD Neonatal Research Network. Childhood outcomes after hypothermia for neonatal encephalopathy. *N Engl J Med* 2012; 366:2085-92.
149. **Azzopardi D, Strohm B, Marlow N, Brocklehurst P, Deierl A, Eddama O et al;** TOBY Study Group. Effects of hypothermia for perinatal asphyxia on childhood outcomes. *N Engl J Med* 2014; 371:140-49.
150. **Icea A, Yoldi ME.** Psychomotor development of the child and its evaluation in primary care. *An Sist Sanit Navar* 2002; 25 Suppl 2:35-43.
151. **Lezine I, Brunet O.** Presentation of a French scale of tests for infants. *Ann Med Psychol (Paris)*. 1950, 108: 499.
152. **Fernandes M, Stein A, Newton CR, Cheikh-Ismail L, Kihara M, Wulff K, et al.** The INTERGROWTH-21st Project Neurodevelopment Package: A novel method for the multi-dimensional assessment of neurodevelopment in pre-school age children. *PLOS ONE*. 2014; 9:e113360.

153. **Rubio-Codina M, Araujo MC, Attanasio O, Muñoz P, Grantham-McGregor S.** Concurrent validity and feasibility of short Tests currently used to measure early childhood development in large scale studies. *PLoS One*. 2016; 11:e0160962.
154. **Jary S, Smit E, Liu X, Cowan FM, Thoresen M.** Less severe cerebral palsy outcomes in infants treated with therapeutic hypothermia. *Acta Paediatr*. 2015; 104:1241-47.
155. **MacLennan AH, Thompson SC, Gecz J.** Cerebral palsy: causes, pathways, and the role of genetic variants. *Am J Obstet Gynecol* 2015; 213:779-88.
156. **Garfinkle J, Wintermark P, Shevell MI, Platt RW, Oskoui M;** Canadian Cerebral Palsy Registry. Cerebral Palsy after Neonatal Encephalopathy: How Much Is Preventable? *J Pediatr* 2015;167:58-63.
157. **Doyle LW, Crowther CA, Middleton P, Marret S, Rouse D.** Magnesium sulphate for women at risk of preterm birth for neuroprotection of the fetus. *Cochrane Database Syst Rev*. 2009;(1):CD004661.
158. **Yeh P, Emary K, Impey L.** The relationship between umbilical cord arterial pH and serious adverse neonatal outcome: analysis of 51 519 consecutive validated samples. *BJOG* 2012; 119:824–831.
159. **Malin GL, Morris RK, Khan KS.** Strength of association between umbilical cord pH and perinatal and long term outcomes: systematic review and meta-analysis. *BMJ* 2010; 340:c1471.
160. **Goldaber KG, Gilstrap LC, Leveno KJ, Dax JS, McIntire DD.** Pathological fetal acidemia. *Obstet Gynecol* 1991; 78:1103–07.
161. **MacLennan A.** A template for defining a causal relation between acute intrapartum events and cerebral palsy: international consensus statement. *BMJ* 1999; 319:1054–59.
162. **Boskabadi H, Ashrafzadeh F, Doosti H, Zakerihamidi M.** Assessment of Risk Factors and Prognosis in asphyxiated infants. *Iran J Pediatr* 2015; 25:e2006.

163. **Futrakul S, Praisuwanna P, Thaitumyanon P.** Risk factors for hypoxic-ischemic encephalopathy in asphyxiated newborn infants. *J Med Assoc Thai* 2006; 89:322-28.
164. **Bekedam DJ, Engelsbel S, Mol BW, Buitendijk SE, van der Pal-de Bruin KM.** Male predominance in fetal distress during labor. *Am J Obstet Gynecol* 2002; 187:1605–67.
165. **Ahmadpour-Kacho M, Zahedpasha Y, Hagshenas M, Akbarian Rad Z, Sadat Nasserri B, Bijani A.** Short Term Outcome of Neonates Born With Abnormal Umbilical Cord Arterial Blood Gases. *Iran J Pediatr* 2015; 25:e174.
166. **Mohamed MA, Aly H.** Impact of race on male predisposition to birth asphyxia. *J Perinatol* 2014; 34:449-52.
167. **Hussein MH, Daoud GA, Kakita H, Hattori A, Murai H, Yasuda M et al.** The sex differences of cerebrospinal fluid levels of interleukin 8 and antioxidants in asphyxiated newborns. *Shock* 2007; 28:154-59.
168. **ACOG Committee on Obstetric Practice.** ACOG Committee Opinion No. 348, November 2006: Umbilical cord blood gas and acid-base analysis. *Obstet Gynecol* 2006; 108:1319–22.
169. **Cahill AG.** Umbilical artery pH and base deficit in obstetrics. *Am J Obstet Gynecol* 2015; 213:257-58.
170. **Olofsson P.** Determination of base excess in umbilical cord blood at birth. *Am J Obstet Gynecol* 2015; 213:259-61.
171. **Low JA, Lindsay BG, Derrick EJ.** Threshold of metabolic acidosis associated with newborn complications. *Am J Obstet Gynecol* 1997; 177:1391-94.
172. **Knutzen L, Svirko E, Impey L.** The significance of base deficit in acidemic term neonates. *Am J Obstet Gynecol* 2015; 213:373.e1-7.
173. **Shah S, Tracy M, Smyth J.** Postnatal lactate as an aerly predictor of short-term outcome after intrapartum asphyxia. *J Perinatol* 2004; 24:16-20.

174. **Tuuli MG, Stout MJ, Shanks A, Odibo AO, Macones GA, Cahill AG.** Umbilical cord arterial lactate compared with pH for predicting neonatal morbidity at term. *Obstet Gynecol* 2014; 124:756-61.
175. **White CR, Doherty DA, Newnham JP, Pennell CE.** The impact of introducing universal umbilical cord blood gas analysis and lactate measurements at delivery. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 2014; 54:71-78.
176. **Fahey J, King TL.** Intrauterine asphyxia: Clinical implications for providers of intrapartum care. *J Midwifery Womens Health* 2005; 50:498-506.
177. **Omo-Aghoja L.** Maternal and fetal acid-base chemistry: a major determinant of perinatal outcome. *Ann Med Health Sci Res* 2014; 4:8-17.
178. **Committee on Fetus and Newborn, American Academy of Pediatrics, and Committee on Obstetric Practice, American College of Obstetricians and Gynecologists.** Use and abuse of the Apgar score. *Pediatrics* 1996; 98:141-42.
179. **Drage JS, Kennedy C, Schwarz BK.** The Apgar score as an index of neonatal mortality. A report from the Collaborative Study of Cerebral Palsy. *Obstet Gynecol* 1964; 24: 222-30.
180. **Casy BM, McIntire DD, Leveno KJ.** The continuing value of the Apgar score for the assessment of newborn infants. *N Engl J Med* 2001; 344:467-71.
181. **Vukojevic M, Soldo I, Granic D.** Risk factors associated with cerebral palsy in newborns. *Coll Antropol* 2009; 33 Suppl 2:199–201.
182. **Carlo WA, Schelonka R.** The outcome of infants with an Apgar score of zero at 10 minutes: past and future. *Am J Obstet Gynecol* 2007; 196:422-3.
183. **Omo-Aghoja L.** Maternal and fetal acid-base chemistry: A major determinant of perinatal outcome. *Ann Med Health Sci Res* 2014; 4:8-17.
184. **Chandrasekaran E, Wiberg N.** Fetal scalp blood sampling during labor: an appraisal of the physiological basis and scientific evidence. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2014; 93:544-47.

185. **Pearson JF.** Fetal blood sampling and gas Exchange. *J Clin Pathol Suppl (R Coll Pathol)* 1976; 10:31-34.
186. **Westgren M, Kruger K, Ek S, Grunevald C, Kublickas M, Naka K et al.** Lactate compared with pH analysis at fetal scalp blood sampling: a prospective randomised study. *Br F Obstet Gynaecol* 1998; 105:29-33.
187. **Allen RM, Bowling FG, Oats JJ.** Determining the fetal scalp lactate level that indicates the need for intervention in labour. *Aust N Z F Obstet Gynaecol* 2004; 44:549-52.
188. **Bowler T, Beckmann M.** Comparing fetal scalp lactate and umbilical cord arterial blood gas values. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 2014; 54:79-83.
189. **Loh SF, Woodworth A, Yeo GS.** Umbilical cord blood gas analysis at delivery. *Singapore Med J* 1998; 39:151-55.
190. **Boo NY, Cheah IG.** The burden of hypoxic-ischaemic encephalopathy in Malaysian neonatal intensive care units. *Singapore Med J* 2016; 57:456-63.
191. **Chalak LF, DuPont TL, Sánchez PJ, Lucke A, Heyne RJ, Morriss MC et al.** Neurodevelopmental outcomes after hypothermia therapy in the era of Bayley-III. *J Perinatol* 2014; 34:629-33.
192. **Torras-Mañá M, Gómez-Morales A, González-Gimeno I, Fornieles-Deu A, Brun-Gasca C.** Assessment of cognition and language in the early diagnosis of autism spectrum disorder: usefulness of the Bayley Scales of infant and toddler development, third edition. *J Intellect Disabil Res.* 2016; 60:502-11.
193. **Torras-Mañá M, Guillamón-Valenzuela M, Ramírez-Mallafré A, Brun-Gasca C, Fornieles-Deu A.** Usefulness of the Bayley scales of infant and toddler development, third edition, in the early diagnosis of language disorder. *Psicothema* 2014; 26:349-56.
194. **Yu YT, Hsieh WS, Hsu CH, Chen LC, Lee WT, Chiu NC et al.** A psychometric study of the Bayley Scales of Infant and Toddler Development - 3rd Edition for term and preterm Taiwanese infants. *Res Dev Disabil.* 2013; 34:3875-83. *J Intellect Disabil Res.* 2016; 60:502-11.

195. **Beligere N, Rao R.** Neurodevelopmental outcome of infants with meconium aspiration syndrome: report of a study and literature review. *J Perinatol* 2008; 28 Suppl 3:S93-101.
196. **Schot MJ, Halbertsma FJ, Katgert T, Bok LA.** Development of children with symptomatic intracranial hemorrhage born after vacuum extraction. *J Child Neurol* 2013; 28:520-23.
197. **Landau Y, Berger I, Marom R, Mandel D, Ben Sira L, Fattal-Valevski A et al.** Therapeutic hypothermia for asphyxiated newborns: experience of an Israeli tertiary center. *Isr Med Assoc J* 2011; 13:29-33.
198. **Law J, Boyle J, Harris F, Harkness A, Nye C.** Prevalence and natural history of primary speech and language delay: Findings from a systematic review of the literature. *Int J Lang Commun Disord*, 2000; 35:165-88.
199. **Tomblin JB, Records NL, Buckwalter P, Zhang X, Smith E, O'Brien M.** The prevalence of specific language impairment in kindergarten children. *J Speech Lang Hear Res* 1997; 40:1245-60.
200. **Miller CA, Kail R, Leonard LB, Tomblin JB.** Speed of processing in children with specific language impairment. *J Speech Lang Hear Res* 2001; 44:416-33.
201. **Leonard LB, Ellis Weismer S, Miller CA, Francis DJ, Tomblin JB, Kail RV.** Speed of processing, working memory, and language impairment in children. *J Speech Lang Hear Res* 2007; 50:408-28.
202. **Hugdahl K, Gundersen H, Brekke C, Thomsen T, Rimol LM, Ersland L et al.** FMRI brain activation in a finnish family with specific language impairment compared with a normal control group. *J Speech Lang Hear Res* 2004; 47:162-72.
203. **Rice ML.** Toward epigenetic and gene regulation models of specific language impairment: looking for links among growth, genes, and impairments. *J Neurodev Disord* 2012; 4:27.
204. **Rice ML.** Language growth and genetics of specific language impairment. *Int J Speech Lang Pathol* 2013; 15:223-33.

205. **Hafström M, Ehnberg S, Blad S, Norén H, Renman C, Rosén KG et al.** Developmental outcome at 6.5 years after acidosis in term newborns: a population-based study. *Pediatrics*. 2012; 129:e1501-07.
206. **Dennis J, Johnson A, Mutch L, Yudkin P, Johnson P.** Acid-base status at birth and neurodevelopmental outcome at four and one-half years. *Am J Obstet Gynecol* 1989; 161:213-20.
207. **Svirko E, Mellanby J, Impey L.** The association between cord pH at birth and intellectual function in childhood. *Early Hum Dev* 2008; 84:37-41.
208. **Wildschut J, Feron FJ, Hendriksen JG, van Hall M, Gavilanes-Jiminez DW, Hadders-Algra M et al.** Acid-base status at birth, spontaneous motor behaviour at term and 3 months and neurodevelopmental outcome at age 4 years in full-term infants. *Early Hum Dev* 2005; 81:535-44.
209. **Lung FW, Shu BC, Chiang TL, Lin SJ.** Maternal mental health and childrearing context in the development of children at 6, 18 and 36 months: a Taiwan birth cohort pilot study. *Child Care Health Dev* 2011; 37:211-23.
210. **Miquelote AF, Santos DC, Caçola PM, Montebelo MI, Gabbard C.** Effect of the home environment on motor and cognitive behavior of infants. *Infant Behav Dev* 2012; 35:329-34.
211. **Murray GK, Veijola J, Moilanen K, Miettunen J, Glahn DC, Cannon TD et al.** Infant motor development is associated with adult cognitive categorisation in a longitudinal birth cohort study. *J Child Psychol Psychiatry* 2006; 47:25-29.
212. **Piek JP, Dawson L, Smith LM, Gasson N.** The role of early fine and gross motor development on later motor and cognitive ability. *Hum Mov Sci.* 2008; 27:668-81.
213. **Bushnell EW, Boudreau JP.** Motor development and the mind: the potential role of motor abilities as a determinant of aspects of perceptual development. *Child Dev* 1993; 64:1005-21.

214. **Bradley RH, Mundfrom DJ, Whiteside L, Casey PH, Barrett K.** A factor analytic study of the infant-toddler and early childhood versions of the HOME Inventory administered to white, black, and Hispanic american parents of children born preterm. *Child Dev.* 1994; 65:880-88.
215. **Christensen DL, Baio J, Van Naarden Braun K, Bilder D, Charles J, Constantino JN et al;** Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Prevalence and Characteristics of autism spectrum disorder among children aged 8 years-autism and developmental disabilities monitoring network, 11 sites, United States, 2012. *MMWR Surveill Summ* 2016 1; 65:1-23.
216. **American Psychiatric Association.** Diagnostic and statistical manual of mental disorders (DSM-5). 5th ed. Washington, DC: American Psychiatric Association; 2013.
217. **Posar A, Visconti P.** Autism in 2016: the need for answers. *J Pediatr (Rio J)*. 2016. pii: S0021-7557(16)30244-3.
218. **Volk HE, Lurmann F, Penfold B, Hertz-Picciotto I, McConnell R.** Traffic-related air pollution, particulate matter, and autism. *JAMA Psychiatry* 2013; 70:71-77.
219. **von Ehrenstein OS, Aralis H, Cockburn M, Ritz B.** In utero exposure to toxic air pollutants and risk of childhood autism. *Epidemiology* 2014; 25:851-58.
220. **Dickerson AS, Rahbar MH, Bakian AV, Bilder DA, Harrington RA, Pettygrove S et al.** Autism spectrum disorder prevalence and associations with air concentrations of lead, mercury, and arsenic. *Environ Monit Assess* 2016; 188:407.
221. **Shelton JF, Geraghty EM, Tancredi DJ, Delwiche LD, Schmidt RJ, Ritz B et al.** Neurodevelopmental disorders and prenatal residential proximity to agricultural pesticides: the CHARGE study. *Environ Health Perspect* 2014; 122:1103-09.

222. **Keil AP, Daniels JL, Hertz-Picciotto I.** Autism spectrum disorder, flea and tick medication, and adjustments for exposure misclassification: the CHARGE (CHildhood Autism Risks from Genetics and Environment) case-control study. *Environ Health* 2014; 13:3.
223. **van Elst K, Bruining H, Birtoli B, Terreaux C, Buitelaar JK, Kas MJ.** Food for thought: dietary changes in essential fatty acid ratios and the increase in autism spectrum disorders. *Neurosci Biobehav Rev* 2014; 45:369-78.
224. **Gao L, Xi QQ, Wu J, Han Y, Dai W, Su YY et al.** Association between prenatal environmental factors and child autism: a case control study in Tianjin, China. *Biomed Environ Sci* 2015; 28:642-50.
225. **Modabbernia A, Mollon J, Boffetta P, Reichenberg A.** Impaired gas Exchange at birth and risk of intellectual disability and autism: a meta-analysis. *J Autism Dev Disord* 2016; 46:1847-59.
226. **Lepage N, McDonald N, Dallaire L, Lambert M.** Age-specific distribution of plasma amino acid concentrations in a healthy pediatric population. *Clin Chem* 1997; 43:2397-402.
227. **Chih-Kuang C, Shuan-Pei L, Shyue-Jye L, Tuan-Jen W.** Plasma free amino acids in Taiwan Chinese: the effect of age. *Clin Chem Lab Med* 2002; 40:378-82.
228. **Cederberg HH, Uhd NC, Brodin B.** Glutamate efflux at the blood-brain barrier: Cellular mechanisms and potential clinical relevance. *Arch Med Res.* 2014; 45:639-45.
229. **Zlotnik A, Tsesis S, Gruenbaum BF, Ohayon S, Gruenbaum SE, Boyko M et al.** Relationship between glutamate, GOT and GPT levels in maternal and fetal blood: a potential mechanism for fetal neuroprotection. *Early Hum Dev* 2012; 88:773-78.
230. **Young M, Prenton MA.** Maternal and fetal plasma amino acid concentrations during gestation and in retarded fetal growth. *J Obstet Gynaecol Br Commonw* 1969; 76:333-34.

231. **Jantzie LL, Cheung PY, Johnson ST, Bigam DL, Todd KG.** Cerebral amino acid profiles after hypoxic-reoxygenation and N-acetylcysteine treatment in the newborn piglet. *Neonatology* 2010; 97:195-203.
232. **Fuchs SA, Peeters-Scholte CM, de Barse MM, Roeleveld MW, Klomp LW, Berger R et al.** Increased concentrations of both NMDA receptor co-agonist D-serine and glycine in global ischemia: a potential novel treatment target for perinatal asphyxia. *Amino Acids* 2012; 43:355-63.
233. **Khashaba MT, Shouman BO, Shaltout AA, Al-Marsafawy HM, Abdel-Aziz MM, Patel K et al.** Excitatory amino acids and magnesium sulfate in neonatal asphyxia. *Brain Dev* 2006; 28:375-9.
234. **Nombela F, Blanco M, Pérez de la Ossa N, Caniego JL, Sobrino T, Escudero D et al.** Neuronal excitotoxicity alter carotid angioplasty and stent placement procedures. *Radiology* 2013; 268:515-20.
235. **Mayoral SR, Omar G, Penn A.** Sex differences in a hipoxia model of preterm brain damage. *Pediatr Res* 2009; 66:248-53.
236. **Arteni NS, Pereira LO, Rodrigues AL, Lavinsky D, Achaval ME, Netto CA.** Lateralized and sex-dependent effects of unilateral neonatal cerebral hipoxia-ischemia in the rat. *Behav Brain Res* 2010; 210: 92-98.
237. **Zlotnik A, Gruenbaum BF, Mohar B, Kuts R, Gruenbaum SE, Ohayon S et al.** The effects of estrogen and progesterone on blood glutamate levels: evidence from changes of blood glutamate levels during the menstrual cycle in women. *Biol Reprod* 2011; 84:581-86.
238. **Ginsberg MD.** Current status of neuroprotection for cerebral ischemia. Synoptic overview. *Stroke* 2009; 40:S111-S4.
239. **Ginsberg MD.** Neuroprotection for ischemic stroke: past, present and future. *Neuropharmacology* 2008; 55:363-89.
240. **Fields RD.** Glutamate receptors: the cause or cure in perinatal white matter injury? *Neuron Glia Biol* 2010; 6:209-11.

241. **George SA, Barrett RD, Bennet L, Mathai S, Jensen EC, Gunn AJ.** Nonadditive neuroprotection with early glutamate receptor blockade and delayed hypothermia after asphyxia in preterm fetal sheep. *Stroke* 2012; 43:3114-17.
242. **Lees KR, Asplund K, Carolei A, Davis SM, Diener HC, Kaste M et al.** Glycine antagonist (gavestinel) in neuroprotection (GAIN International) in patients with acute stroke: a randomised controlled trial. *Lancet* 2000; 355, 1949-54.
243. **Muir KW, Lees KR, Ford I, Davis S;** Intravenous Magnesium Efficacy in Stroke (IMAGES) Study Investigators. Magnesium for acute stroke (Intravenous Magnesium Efficacy in Stroke trial): randomised controlled trial. *Lancet* 2004; 363: 439-45.
244. **Albers GW, Sáenz RE, Moses JA Jr, Choi DW.** Safety and tolerance of oral dextromethorphan in patients at risk for brain ischemia. *Stroke* 1991; 22:1075–77.
245. **Huber M, Kittner B, Hojer C, Fink GR, Neveling M, Heiss WD.** Effect of propentofylline on regional cerebral glucose metabolism in acute ischemic stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 1993; 1:526–30.
246. **Diener HC, Hacke W, Hennerici M, Rådberg J, Hantson L, De Keyser J.** Lubeluzole in acute ischemic stroke. A double-blind, placebo-controlled phase II trial. Lubeluzole International Study Group. *Stroke* 1996; 27:76–81.
247. **Gressens P, Spedding M, Gigler G, Kertesz S, Villa P, Medja F et al.** The effects of AMPA receptor antagonists in models of stroke and neurodegeneration. *Eur J Pharmacol* 2005; 519: 58–67.
248. **Fuchs SA, Peeters-Scholte CM, de Barse MM, Roeleveld MW, Klomp LW, Berger R et al.** Increased concentrations of both NMDA receptor co-agonists D-serine and glycine in global ischemia: a potencial novel treatment targer for perinatal asphyxia. *Amino Acids* 2012; 43:355-63.
249. **Kohara A, Takahashi M, Yatsugi S, Tamura S, Shitaka Y, Hayashibe S et al.** Neuroprotective effects of the selective type 1 metabotropic glutamate receptor antagonist YM-202074 in rat stroke models. *Brain Res* 2008; 29; 1191:168-79.

250. **Franke CL, Palm R, Dalby M, Schoonderwaldt HC, Hantson L, Eriksson B et al.** Flunarizine in stroke treatment (FIST): a double-blind, placebo-controlled trial in Scandinavia and the Netherlands. *Acta Neurol Scand* 1996; 93:56-60.
251. **Muir KW, Holzapfel L, Lees KR.** Phase II clinical trial of sipatrigine (619C89) by continuous infusion in acute stroke. *Cerebrovasc Dis* 2000; 10:431-36.
252. **Thöne-Reineke C, Neumann C, Namsolleck P, Schmerbach K, Krikov M, Scheffé JH et al.** The beta-lactam antibiotic, ceftriaxone, dramatically improves survival, increases glutamate uptake and induces neurotrophins in stroke. *J Hypertens*. 2008; 26:2426-35.
253. **Kong Q, Chang LC, Takahashi K, Liu Q, Schulte DA, Lai L et al.** Small-molecule activator of glutamate transporter EAAT2 translation provides neuroprotection. *J Clin Invest* 2014; 124:1255-67.
254. **Teichberg VI, Cohen-Kashi-Malina K, Cooper I, Zlotnik A.** Homeostasis of glutamate in brain fluids: an accelerated brain-to-blood efflux of excess glutamate is produced by blood glutamate scavenging and offers protection from neuropathologies. *Neuroscience* 2009; 158: 301–88.
255. **Campos F, Rodríguez-Yáñez M, Castellanos M, Arias S, Pérez-Mato M, Sobrino T et al.** Blood levels of glutamate oxaloacetate transaminase are more strongly associated with good outcome in acute ischaemic stroke than glutamate pyruvate transaminase levels. *Clin Sci (Lond)* 2011; 121: 11–17.
256. **Boyko M, Stepensky D, Gruenbaum BF, Gruenbaum SE, Melamed I, Ohayon S et al.** Pharmacokinetics of glutamate-oxaloacetate transaminase and glutamate-pyruvate transaminase and their blood glutamate-lowering activity in Naive rats. *Neurochem Res* 2012; 37:2198-205.
257. **Campos F, Sobrino T, Ramos-Cabrera P, Argibay B, Agulla J, Pérez-Mato M et al.** Neuroprotection by glutamate oxaloacetate transaminase in ischemic stroke: an experimental study. *J Cereb Blood Flow Metab* 2011; 31:1378–86.

258. **Campos F, Sobrino T, Ramos-Cabrer P, Castillo J.** Oxalacetate: a novel neuroprotective for acute ischemic stroke. *Int J Biochem Cell Biol* 2012; 44:262-65.
259. **Leibowitz A, Boyko M, Shapira Y, Zlotnik A.** Blood glutamate scavenging: insight into neuroprotection. *Int J Mol Sci* 2012; 13:10041–66.
260. **Khanna S, Briggs Z, Rink C.** Inducible glutamate oxaloacetate transaminase as a therapeutic target against ischemic stroke. *Antioxid Redox Signal* 2015; 10; 22: 175–86.
261. **Pérez-Mato M, Ramos-Cabrer P, Sobrino T, Blanco M, Ruban A, Mirelman D et al.** Human recombinant glutamate oxalacetate transaminase 1 (GOT1) supplemented with oxalacetate induces a protective effect after cerebral ischemia. *Cell Death Dis* 2014; 5:e992.
262. **Islam MT, Islam MN, Mollah AH, Hoque MA, Hossain MA, Nazir F et al.** Status of liver enzymes in babies with perinatal asphyxia. *Mymensingh Med J* 2011; 20:446-49.
263. **Gibson PR, Dudley FJ.** Ischemic hepatitis: clinical features, diagnosis and prognosis. *Aust N Z J Med* 1984; 14:822-25.
264. **Campos F, Sobrino T, Ramos-Cabrer P, Castellanos M, Blanco M, Rodríguez-Yáñez M et al.** High blood glutamate oxaloacetate transaminase levels are associated with good functional outcome in acute ischemic stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 2011; 31:1387–93.
265. **Zacharakis G, Koskinas J, Kotsiou S, Pouliou E, Papoutselis M, Tzara F et al.** Natural history of chronic hepatitis B virus infection in children of different ethnic origins: a cohort study with up to 12 years' follow-up in northern. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2007; 44:84–91.
266. **Kerkar N.** Hepatitis B in children: complexities in management. *Pediatr Transplant* 2005; 9:685–91.

267. **Davison SM, Mieli-Vergani G, Sira J, Kelly DA.** Perinatal hepatitis C virus infection: diagnosis and management. *Arch Dis Child* 2006; 91:781–85.
268. **Quirós-Tejeira RE, Rivera CA, Ziba TT, Mehta N, Smith CW, Butte NF.** Risk for nonalcoholic fatty liver disease in Hispanic youth with BMI > or ¼95th percentile. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2007; 44:228–36.
269. **European Paediatric Hepatitis C Virus Network.** Three broad modalities in the natural history of vertically acquired hepatitis C virus infection. *Clin Infect Dis* 2005; 41:45–51.
270. **Dillon JF, Miller MH.** Gamma glutamyl transferase ‘To be or not to be’ a liver function test? *Ann Clin Biochem.* 2016; 53:629-31.
271. **Cabrera-Abreu JC, Green A.** Gamma-glutamyltransferase: value of its measurement in paediatrics. *Ann Clin Biochem* 2002; 39(Pt 1):22-25.
272. **Campos F, Sobrino T, Pérez-Mato M, Rodríguez-Osorio X, Leira R, Blanco M et al.** Glutamate oxaloacetate transaminase: A new key in the dysregulation of glutamate in migraine patients. *Cephalalgia* 2013; 33:1148-54.
273. **Sutton TM, O'Brien JF, Kleinberg F, House RF Jr, Feldt RH.** Serum levels of creatine phosphokinase and its isoenzymes in normal and stressed neonates. *Mayo Clin Proc* 1981; 56:150-54.
274. **Bodensteiner JB, Zellweger H.** Creatine phosphokinase in normal neonates and young infants. *J Lab Clin Med.* 1971; 77:853-58.
275. **Cao A, Trabalza N, DeVirgiliis S, Furbetta M, Coppa G.** Serum creatine kinase activity and serum creatine kinase isoenzymes in newborn infants. *Biol Neonate* 1971; 17:126-34.
276. **Kinoshita H, Imamura T, Maeda H, Shibukawa Y, Fukuda Y, Kin S et al.** Brain hypothermia therapy for neonatal hypoxic-ichemic encephalopathy with a severely elevated serum creatine kinase level. *Fukushima J Med Sci* 2015; 61:54-57.

277. **Hayakawa M, Ito Y, Saito S, Mitsuda N, Hosono S, Yoda H et al;** Executive Committee, Symposium on Japan Society of Perinatal and Neonatal Medicine. Incidence and prediction of outcome in hypoxic-ischemic encephalopathy in Japan. *Pediatr Int* 2014; 56:215-21.
278. **Warburton D, Singer DB, Oh W.** Effects of acidosis on the activity of creatine phosphokinase and its isoenzymes in the serum of newborn infants. *Pediatrics*. 1981; 68:195-97.
279. **Beken S, Aydın B, Dilli D, Erol S, Zenciroğlu A, Okumuş N.** Can biochemical markers predict the severity of hypoxic-ischemic encephalopathy? *Turk J Pediatr* 2014; 56:62-8.
280. **Gupta BD, Sharma P, Bagla J, Parakh M, Soni JP.** Renal failure in asphyxiated neonates. *Indian Pediatr* 2005; 42:928-34.
281. **Sweetman DU, Onwuneme C, Watson WR, O'Neill A, Murphy JF, Molloy EJ.** Renal function and novel urinary biomarkers in infants with neonatal encephalopathy. *Acta Paediatr* 2016; 105:e513-e519.
282. **Türker G, Babaoğlu K, Gökalg AS, Sarper N, Zengin E, Arisoy AE.** Cord blood cardiac troponin I as an early predictor of short-term outcome in perinatal hypoxia. *Biol Neonate* 2004; 86:131-37.
283. **Hassell KJ, Ezzati M, Alonso-Alconada D, Hausenloy DJ, Robertson NJ.** New horizons for newborn brain protection: enhancing endogenous neuroprotection. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2015; 100:F541-52.
284. **Mergenthaler P, Dirnagl U.** Protective conditioning of the brain: expressway or roadblock? *J Physiol* 2011; 589: 4147-55.
285. **Cardinali DP, Pagano ES, Scacchi Bernasconi PA, Reynoso R, Scacchi P.** Melatonin and mitochondrial dysfunction in the central nervous system. *Horm Behav* 2013; 63: 322-30.

286. **Thomas L, Purvis CC, Drew JE, Abramovich DR, Williams LM.** Melatonin receptors in human fetal brain: 2-[(125)I] iodomelatonin binding and MT1 gene expresión. *J Pineal Res* 2002; 33:218-24.
287. **Robertson NJ, Faulkner S, Fleiss B, Bainbridge A, Andorka C, Price D et al.** Melatonin augments hypothermic neuroprotection in a perinatal asphyxia model. *Brain* 2013; 136 (Pt 1):90-105.
288. **Aly H, Elmahdy H, El-Dib M, Rowisha M, Awny M, El-Gohary T et al.** Melatonin use for neuroprotection in perinatal asphyxia: a randomized controlled pilot study. *J Perinatol* 2015; 35:186-91.
289. **Villapol S, Fau S, Renolleau S, Biran V, Charriaut-Marlangue C, Baud O.** Melatonin promotes myelination by decreasing white matter inflammation after neonatal stroke. *Pediatr Res* 2011; 69:51-55.
290. **Tamura H, Nakamura Y, Terron MP, Flores LJ, Manchester LC, Tan DX et al.** Melatonin and pregnancy in the human. *Reprod Toxicol* 2008; 25:291-303.
291. **Fernández-Ruiz J, Berrendero F, Hernández ML, Ramos JA.** The endogenous cannabinoid system and brain development. *Trends Neurosci* 2000; 23:14-20.
292. **Panikashvili D, Simeonidou C, Ben-Shabat S, Hanus L, Breuer A, Mechoulam R et al.** An endogenous cannabinoid (2-AG) is neuroprotective after brain injury. *Nature* 2001; 413:527-31.
293. **Alonso-Alconada D, Alvarez A, Alvarez FJ, Martínez-Orgado JA, Hilario E.** The cannabinoid WIN 55212-2 mitigates apoptosis and mitochondrial dysfunction after hypoxia ischemia. *Neurochem Res* 2012; 37: 161-70.
294. **Alonso-Alconada D, Alvarez FJ, Alvarez A, Mielgo VE, Goñi-de-Cerio F, Rey-Santano MC et al.** The cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 reduces the initial cerebral damage after hypoxic-ischemic injury in fetal lambs. *Brain Res* 2010; 1362:150-59.
295. **Van de Looij Y, Chatagner A, Quairiaux C, Gruetter R, Hüppi PS, Sizonenko SV.** Multi-modal assessment of long-term erythropoietin treatment after neonatal hypoxic-ischemic injury in rat brain. *PLoS One* 2014; 9:e95643.

296. **Traudt CM, McPherson RJ, Bauer LA, Richards TL, Burbacher TM, McAdams RM et al.** Concurrent erythropoietin and hypothermia treatment improve outcomes in a term nonhuman primate model of perinatal asphyxia. *Dev Neurosci* 2013; 35:491-503.
297. **Rogers EE, Bonifacio SL, Glass HC, Juul SE, Chang T, Mayock DE et al.** Erythropoietin and hypothermia for hypoxic-ischemic encephalopathy. *Pediatr Neurol* 2014; 51:657-62.
298. **Kellert BA, McPherson RJ, Juul SE.** A comparison of high-dose recombinant erythropoietin treatment regimens in brain-injured neonatal rats. *Pediatr Res* 2007; 61:451-55.
299. **El Shimi MS, Awad HA, Hassanein SM, Gad GI, Imam SS, Shaaban HA et al.** Single dose recombinant erythropoietin versus moderate hypothermia for neonatal hypoxic ischemic encephalopathy in low resource settings. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2014; 27:1295-300.
300. **Palmer C, Towfighi J, Roberts RL, Heitjan DF.** Allopurinol administered after inducing hypoxia-ischemia reduces brain injury in 7-day-old rats. *Pediatr Res* 1993; 33:405-11.
301. **Gunes T, Ozturk MA, Koklu E, Kose K, Gunes I.** Effect of allopurinol supplementation on nitric oxide levels in asphyxiated newborns. *Pediatr Neurol* 2007; 36:17-24.
302. **Torrance HL, Benders MJ, Derks JB, Rademaker CM, Bos AF, Van Den Berg P et al.** Maternal allopurinol during fetal hypoxia lowers cord blood levels of the brain injury marker S-100B. *Pediatrics* 2009; 124:350-57.
303. **Kaandorp JJ, van Bel F, Veen S, Derks JB, Groenendaal F, Rijken M et al.** Long-term neuroprotective effects of allopurinol after moderate perinatal asphyxia: follow-up of two randomised controlled trials. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2012; 97:F162-6.

304. **Marret S, Doyle LW, Crowther CA, Middleton P.** Antenatal magnesium sulphate neuroprotection in the preterm infant. *Semin Fetal Neonatal Med* 2007; 12:311-17.
305. **Sugimoto J, Romani AM, Valentin-Torres AM, Luciano AA, Ramirez Kitchen CM, Funderburg N et al.** Magnesium decreases inflammatory cytokine production: a novel innate immunomodulatory mechanism. *J Immunol* 2012; 188:6338-46.
306. **Itoh K, Maki T, Shindo A, Egawa N, Liang AC, Itoh N et al.** Magnesium sulfate protects oligodendrocyte lineage cells in a rat cell-culture model of hypoxic-ischemic injury. *Neurosci Res* 2016; 106:66-69.
307. **Tataranno ML, Perrone S, Longini M, Buonocore G.** New antioxidant drugs for neonatal brain injury. *Oxid Med Cell Longev* 2015;2015:108251.
308. **Doyle LW, Crowther CA, Middleton P, Marret S, Rouse D.** Magnesium sulphate for women at risk of preterm birth for neuroprotection of the fetus. *Cochrane Database Syst Rev* 2009;CD004661.
309. **Bozkurt O, Eras Z, Canpolat FE, Oguz SS, Uras N, Dilmen U et al.** Antenatal magnesium sulfate and neurodevelopmental outcome of preterm infants born to preeclamptic mothers. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2016; 29:1101-4.
310. **Zhu H, Meloni BP, Bojarski C, Knuckey MW, Knuckey NW.** Post-ischemic modest hypothermia (35 degrees C) combined with intravenous magnesium is more effective at reducing CA1 neuronal death than either treatment used alone following global cerebral ischemia in rats. *Exp Neurol* 2005; 193:361-68.
311. **Filippi L, Poggi C, la Marca G, Furlanetto S, Fiorini P, Cavallaro G et al.** Oral topiramate in neonates with hypoxic ischemic encephalopathy treated with hypothermia: a safety study. *J Pediatr* 2010; 157:361-6.
312. **Hobbs C, Thoresen M, Tucker A, Aquilina K, Chakkarapani E, Dingley J.** Xenon and hypothermia combine additively, offering long-term functional and histopathologic neuroprotection after neonatal hypoxia/ ischemia. *Stroke* 2008; 39:1307-13.

313. **Azzopardi D, Robertson NJ, Bainbridge A, Cady E, Charles-Edwards G, Deierl A et al.** Moderate hypothermia within 6 h of birth plus inhaled xenon versus moderate hypothermia alone after birth asphyxia (TOBY-Xe): a proof-of-concept, open-label, randomised controlled trial. *Lancet Neurol* 2015. pii: S1474-4422(15)00347-6.
314. **Zhao H, Mitchell S, Ciechanowicz S, Savage S, Wang T, Ji X et al.** Argon protects against hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats through activation of nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2. *Oncotarget* 2016; 7:25640-51.
315. **Park WS, Sung SI, Ahn SY, Yoo HS, Sung DK, Im GH et al.** Hypothermia Augments Neuroprotective Activity of Mesenchymal Stem Cells for Neonatal Hypoxic-Ischemic Encephalopathy. *PloS One* 2015; 10:e0120893.
316. **Mueller M, Wolfs TG, Schoeberlein A, Gavilanes AW, Surbek D, Kramer BW.** Mesenchymal stem/ stromal cells_ a key mediator for regeneration after perinatal morbidity? *Mol Cell Pediatr* 2016; 3:6.
317. **Jellema RK, Ophelders DR, Zwanenburg A, Nikiforou M, Delhaas T, Andriessen P et al.** Multipotent adult progenitor cells for hypoxic-ischemic injury in the preterm brain. *J Neuroinflammation* 2015; 12:241.
318. **Jellema RK, Wolfs TG, Lima Passos V, Zwanenburg A, Ophelders DR, Kuypers E et al.** Mesenchymal stem cells induce T-cell tolerance and protect the preterm brain after global hypoxia-ischemia. *PloS One* 2013; 8:e73031.
319. **Yıldız EP, Ekici B, Tath B.** Neonatal hypoxic ischemic encephalopathy: an update on disease pathogenesis and treatment. *Expert Rev Neurother* 2016:1-11.
320. **Covey MV, Oorschot DE.** Effect of hypothermic post-treatment on hypoxic-ischemic striatal injury, and normal striatal development, in neonatal rats: a stereological study. *Pediatr Res* 2007; 62:646–51.
321. **Taylor DL, Mehmet H, Cady EB, Edwards AD.** Improved neuroprotection with hypothermia delayed by 6 hours following cerebral hypoxia-ischemia in the 14-day-old rat. *Pediatr Res* 2002; 51:13–19.

322. **Iwata O, Iwata S, Thornton JS, De Vita E, Bainbridge A, Herbert L et al.** “Therapeutic time window” duration decreases with increasing severity of cerebral hypoxia-ischaemia under normothermia and delayed hypothermia in newborn piglets. *Brain Res* 2007; 1154:173–80.
323. **Laptook AR, Corbett RJ, Sterett R, Burns DK, Tollefsbol G, Garcia D.** Modest hypothermia provides partial neuroprotection for ischemic neonatal brain. *Pediatr Res* 1994; 35 (4Pt1):436–42.
324. **Chakkarapani E, Dingley J, Liu X, Hoque N, Aquilina K, Porter H et al.** Xenon enhances hypothermic neuroprotection in asphyxiated newborn pigs. *Ann Neurol* 2010; 68:330–41.
325. **Alonso-Alconada D, Broad KD, Bainbridge A, Chandrasekaran M, Faulkner SD, Kerenyi Á et al.** Brain cell death is reduced with cooling by 3.5 degrees C to 5 degrees C but increased with cooling by 8.5 degrees C in a piglet asphyxia model. *Stroke* 2015; 46:275–78.
326. **Towfighi J, Mauger D, Vannucci RC, Vannucci SJ.** Influence of age on the cerebral lesions in an immature rat model of cerebral hypoxia-ischemia: a light microscopic study. *Brain Res Dev Brain Res* 1997; 100:149–60.
327. **Wood T, Osredkar D, Puchades M, Maes E, Falck M, Flatebø T et al.** Treatment temperature and insult severity influence the neuroprotective effects of therapeutic hypothermia. *Sci Rep* 2016; 6:23430.
328. **Thoresen M, Tooley J, Liu X, Jary S, Fleming P, Luyt K et al.** Time is brain: starting therapeutic hypothermia within three hours after birth improves motor outcome in asphyxiated newborns. *Neonatology* 2013; 104:228–33.
329. **Yager JY, Armstrong EA, Jaharus C, Saucier DM, Wirrell EC.** Preventing hyperthermia decreases brain damage following neonatal hypoxic-ischemic seizures. *Brain Res* 2004; 1011:48–57.
330. **Zeiner A, Holzer M, Sterz F, Schörkhuber W, Eisenburger P, Havel C et al.** Hyperthermia after cardiac arrest is associated with an unfavorable neurologic outcome. *Arch Intern* 2001; 161:2007–12.

331. **Laptook A, Tyson J, Shankaran S, McDonald S, Ehrenkranz R, Fanaroff A et al;** National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network. Elevated temperature after hypoxic-ischemic encephalopathy: risk factor for adverse outcomes. *Pediatrics* 2008; 122:491–99.
332. **Nielsen N, Wetterslev J, Cronberg T, Erlinge D, Gasche Y, Hassager C et al.** Targeted temperature management at 33°C versus 36°C after cardiac arrest. *N Engl J Med.* 2013; 369:2197–206.
333. **Mourvillier B, Tubach F, van de Beek D, Garot D, Pichon N, Georges H et al.** Induced hypothermia in severe bacterial meningitis: a randomized clinical trial. *JAMA* 2013; 310:2174–83.
334. **Wintermark P, Boyd T, Gregas MC, Labrecque M, Hansen A.** Placental pathology in asphyxiated newborns meeting the criteria for therapeutic hypothermia. *Am J Obstet Gynecol* 2010; 203:579.e1–9.
335. **Jenkins DD, Lee T, Chiuzan C, Perkel JK, Rollins LG, Wagner CL et al.** Altered circulating leukocytes and their chemokines in a clinical trial of therapeutic hypothermia for neonatal hypoxic ischemic encephalopathy. *Pediatr Crit Care Med* 2013; 14:786-95.
336. **Apgar V.** A proposal for a new method of evaluation of the newborn infant. *Curr Res Anesth Analg* 1953; 32:260-67.
337. **Casey BM, McIntire DD, Leveno KJ.** The continuing value of the Apgar score for the assessment of newborn infants. *N Engl J Med.* 2001; 344:467-71.

XIII. PUBLICACIONES





Parte de este trabajo se encuentra recogido en las siguientes publicaciones:

Pérez-Mato M, Iglesias-Deus A, Rujido S, da Silva-Candal A, Sobrino T, Couce ML, Fraga JM, Castillo J, Campos F. Potential protective role of endogenous glutamate-oxaloacetate transaminase against glutamate excitotoxicity in fetal hypoxic-ischaemic asphyxia. *Dev Med Child Neurol* 2016; 58:57-62. Factor de impacto 3,615; Q1D1

Iglesias-Deus A, Campos F, Correa-Paz C, Sobrino T, Fraga JM, Castillo J, Couce ML. Hepatic damage and glutamate oxaloacetate transaminase elevations during fetal asphyxia. *Dev Med Child Neurol* 2017; 59:233-234. Factor de impacto 3,613; Q1D1



Potential protective role of endogenous glutamate-oxaloacetate transaminase against glutamate excitotoxicity in fetal hypoxic–ischaemic asphyxia

MARÍA PÉREZ-MATO^{1*} | ALICIA IGLESIAS-DEUS^{2*} | SUSANA RUJIDO² | ANDRÉS DA SILVA-CANDAL¹ | TOMÁS SOBRINO¹ | MARÍA-LUZ COUCE² | JOSÉ MARÍA FRAGA² | JOSÉ CASTILLO¹ | FRANCISCO CAMPOS¹

1 Clinical Neurosciences Research Laboratory, Clinical University Hospital, Health Research Institute of Santiago de Compostela (IDIS), University of Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, A Coruña; **2** Neonatology Unit, Department of Pediatrics, Hospital Clínico Universitario de Santiago, Health Research Institute of Santiago de Compostela (IDIS), Santiago de Compostela, A Coruña, Spain.

Correspondence to Francisco Campos at Department of Neurology, Clinical Neurosciences Research Laboratory, Hospital Clínico Universitario, Travesía da Choupana S/N, 15706 – Santiago de Compostela, Spain. E-mail: francisco.campos.perez@sergas.es

*These authors contributed equally to this work.

PUBLICATION DATA

Accepted for publication 22nd June 2015.
Published online

ABBREVIATION

GOT Glutamate-oxaloacetate
transaminase

AIM Fetal blood contains higher concentrations of glutamate-oxaloacetate transaminase (GOT; a blood enzyme able to metabolize glutamate) than maternal blood. The aim of this study was to determine the relationship between GOT and glutamate levels in arterial blood samples from umbilical cord in control newborn infants and newborn infants with hypoxic–ischaemic insult and/or symptoms of hypoxia–ischemia after delivery.

METHOD A total of 46 newborn infants (28 females, 18 males) were prospectively included in the study. Twenty-three infants (18 females, five males) were included as control participants and 23 (10 females, 13 males) were included as newborn infants at risk of adverse neurological outcome (defined as umbilical blood with pH <7.1).

RESULTS Analysis of glutamate concentration and GOT activity in umbilical blood samples showed that newborn infants with pH <7.1 had higher levels of glutamate (142.4 μmol/L [SD 61.4] vs 62.8 μmol/L [SD 25.5]; $p < 0.001$) and GOT (83.1 U/L [SD 60.9] vs 34.9 U/L [SD 18.2]; $p < 0.001$) compared to newborn infants without fetal distress. Analysis of Apgar scores and blood pH values (markers of perinatal distress) showed that conditions of severe distress were associated with higher glutamate and GOT levels.

INTERPRETATION During fetal development, the ability of GOT to metabolize glutamate suggests that this enzyme can act as an endogenous protective mechanism in the control of glutamate homeostasis.

Fetal asphyxia or hypoxic–ischaemic encephalopathy remains an important cause of perinatal death and long-term developmental disability. Clinical data indicates that if untreated, 60% of infants with severe asphyxia will die and surviving infants will have a high probability of being diagnosed with cerebral palsy.^{1–3}

The short-term clinical consequences include persistent low Apgar scores, multiple organ failure, and neurological sequelae. In the long term this may result in cerebral palsy, intellectual disability, visual and acoustic impairment, and epilepsy.⁴ Therefore the development of new and effective therapies to be used during the fetal asphyxia is in high demand.

Among the different biochemical mechanisms that can damage the neuronal tissue after fetal asphyxia, it has been established that the release of excessive amounts of glutamate into the cerebral extracellular space plays a central role in pathology.^{5,6} In this regard, glutamate antagonists

have been proposed as potential therapeutic agents to reduce the effects of asphyxia in the affected infants. However, their use has important limitations in newborn infants because of the critical role of the glutamatergic system during brain development.^{7,8}

Glutamate receptors, mainly the *N*-methyl-D-aspartate receptor, are important for brain development and neurotransmissions in the neonatal brain. Expression and activity of *N*-methyl-D-aspartate receptors appear to be increased during development, which makes the immature brain extremely vulnerable to neurotoxicity produced by increased concentrations of glutamate during a hypoxic–ischaemic insult.^{9,10} Therefore, the levels of glutamate in the fetal circulation are strictly regulated in the central nervous system by glutamate transporter proteins (high-affinity, sodium-dependent glutamate transporters, also known as excitatory amino acid transporters). The excitatory amino acid transporters are responsible for the removal of gluta-

mate from the extracellular fluid and thus for maintenance of non-toxic concentrations of glutamate. In addition to the excitatory amino acid transporters responsible for the regulation of glutamate activity in the fetal nervous system, it is thought that glutamate transporters located in the placenta also actively participate in the absorption of glutamate from the fetal circulation to protect the fetus from neurotoxic levels.^{11,12}

It has recently been reported that glutamate-oxaloacetate transaminase (GOT), a blood enzyme able to convert glutamate to its non-toxic metabolite, α -ketoglutarate, is present in higher concentration levels in fetal blood than maternal blood. In addition, it was also observed that elevated concentration of GOT in fetal blood was directly correlated with the concentration of blood glutamate.¹³ These findings supported the idea that the elimination of glutamate does not rely solely on the placenta and excitatory amino acid transporters, and that other mechanisms such as GOT activity may participate in maintenance of non-toxic concentrations of glutamate during brain development.^{13–15} This has led to the suggestion that GOT can be used as a potential treatment for the increased concentration of glutamate after fetal asphyxia. However, to date there is still no clear clinical evidence that demonstrates the role of GOT as an endogenous protective mechanism against glutamate toxicity during fetal development or its potential therapeutic use.

Based on the well-known increase of glutamate after fetal asphyxia, we analysed the relationship between GOT and glutamate levels in arterial umbilical cord blood samples from control newborn infants and newborn infants with symptoms of hypoxia-ischemia.

METHOD

Study population

This prospective cross-sectional observational study was carried out in accordance with the Declaration of Helsinki of the World Medical Association (2008) and approved by the Ethics Committee of Clinical Research of Galicia (CEIC). After a full explanation of the procedures, written informed parental consent was obtained before sampling commenced. A total of 46 infants (28 females and 18 males) born at the University Hospital of Santiago de Compostela were prospectively included in the study. Newborn infants ($n=23$, 10 females, 13 males) with hypoxic-ischaemic insult were included in the study when any of the following conditions occurred: pH <7.1 in umbilical cord arterial blood; Apgar ≤ 5 for longer than 5 minutes; intubation or cardiac massage; or respiratory support. Newborn infants with hypoxic-ischaemic encephalopathy were included when all the previous situations occurred and there was evidence of symptoms of neurological alterations or multiple organ failure. The main endpoint of this study was considered hypoxic-ischaemic asphyxia.

Newborn infants at risk of adverse neurological outcomes were defined as pH <7.1 in umbilical cord arterial

What this paper adds

- Correlation of glutamate and glutamate-oxaloacetate transaminase (GOT) in fetal asphyxia.
- GOT in the control of glutamate homeostasis during development.
- Potential use of GOT as treatment in fetal asphyxia.

blood in the moment of delivery.^{16,17} It is currently accepted in many obstetric units that cord acidemia (arterial blood pH <7.1) acts a marker for neurological outcomes and help to identify potential cases of fetal hypoxia.^{16,17}

We also included 23 participants (18 females, five males) with no risk of adverse neurological outcome as a control group. The recruitment period was from October 2013 to June 2014. Females were included if their completed gestation period was 35 weeks or more.

Clinical and biochemical variables

The clinical and biochemical variables recorded in the study are listed in Appendix S1 (online supporting information).

Biochemical analysis

See Appendix S1 for details of the pH analysis and measuring the concentration of bicarbonate (HCO_3^-), concentration of base excess (BE), and lactate levels in the control and experimental blood samples.

Appendix S1 also gives details on the protocols used to determine the serum glutamate concentration and the serum GOT activity, along with the details of statistical analysis.

RESULTS

Descriptive analysis

Table I shows the baseline clinical characteristics and laboratory parameters of newborn infants at risk of adverse neurological outcomes and the control group. No evidence was found for a difference in the mean weight, mean length, mean head circumference, mean gestational age, mean heart rate, or mean axillary temperature. Factors associated with newborn infants with symptoms of hypoxia-ischemia included male infants, higher mean levels of blood glutamate and GOT activity, as well as higher Apgar mean scores.

In the control group, nine newborn infants were born by vertex vaginal delivery, one by instrumented delivery (forceps), and 12 by Caesarean section previously recommended (because of pelvic stenosis, multiple myomectomy, Crohn disease, vasa previa, lichen sclerosus, cerebral aneurysm, previous Caesarean section, laparocoele, or breech birth). Only one newborn infant was delivered by urgent Caesarean because of a suspected loss of fetal well-being. Control participants presented normal clinical parameters on delivery.

In the hypoxic-ischaemic group, five infants were born by vertex vaginal delivery, 10 by instrumented delivery (forceps and vacuum), one by Caesarean because of breech birth, and seven by urgent Caesarean section.

Table 1: Baseline clinical characteristics and laboratory parameters of newborn infants at risk of adverse neurological outcomes (pH <7.1 in umbilical cord arterial blood) and control participants with no risk of adverse neurological outcomes

	Without risk of adverse neurological outcomes <i>n</i> =23 Mean (SD)	Risk of adverse neurological outcomes <i>n</i> =23 Mean (SD)	<i>p</i>
Males (%)	21	56	0.017
Weight (g)	3268.6 (445.4)	3134.7 (355.6)	0.486
Length (cm)	49.0 (2.3)	49.1 (2.4)	0.354
Head circumference (cm)	34.3 (1.5)	34.2 (1.6)	0.168
Gestational age (wks)	39.4 (1.1)	39.3 (1.5)	0.713
Heart rate (bpm)	141.4 (16.5)	131.7 (43.2)	0.045
Axillary temperature (U/L)	36.4 (0.5)	36.4 (0.9)	0.811
GOT (U/L)	34.9 (18.2)	83.1 (60.9)	<0.001
Glutamate (μmol/L)	62.8 (25.5)	142.4 (61.4)	<0.001
	Median (percentiles)	Median (percentiles)	
Apgar score	9.5 [9, 10]	7 [6, 9]	<0.001

Results are expressed as percentages for categorical variables, and as mean (SD) or median and range (25th and 75th centiles) for the continuous variables depending on whether their distribution was normal or not. Data were compared using Welch's *t*-test, proportions (sex) were compared using χ^2 test and Apgar scores compared using Wilcoxon Rank Sum test. GOT, glutamate-oxaloacetate transaminase.

Seven (30%) of the newborn infants included in the hypoxic-ischaemic group were subjected to prolonged cardiopulmonary resuscitation, two of them were treated

with adrenaline and six (26%) with sodium bicarbonate (intravenous). Three patients (13%) received isotonic saline. Eight patients (34%) had mild to severe hypoxic-ischaemic encephalopathy. Six patients were treated with passive hypothermia following the neonatal unit protocols at the Hospital of Santiago de Compostela. Two patients were treated afterwards with active hypothermia. One patient with severe hypoxic-ischaemic encephalopathy died 5 hours after delivery. Twenty-one patients had normal neurological evaluations when they left the hospital; one patient died and another patient treated with hypothermia presented with Horner Syndrome and residual cerebral oedema analysed by magnetic resonance imaging.

Serum glutamate and GOT activity levels in newborn infants with and without hypoxic-ischaemic asphyxia

Analysis of glutamate and GOT activity levels from umbilical blood samples showed that newborn infants at risk of adverse neurological outcomes presented higher mean levels of both parameters compared to control newborn infants (glutamate: 142.4 μmol/L [SD 61.4] vs 62.8 μmol/L [SD 25.5], $p<0.001$; GOT: 83.1 U/L [SD 60.9] vs 34.9 U/L [SD 18.2], $p<0.001$) (Table 1). Likewise, blood glutamate and GOT activity levels were negatively correlated with blood pH (grade of perinatal distress) (Fig. 1). Thus newborn infants with lower blood pH values (<7.0) had higher serum glutamate and GOT levels; in contrast, higher blood pH values (values close to normal pH ≥ 7.26) showed lower blood glutamate concentration and GOT activity. We also found a negative correlation between Apgar score at 5 minutes after delivery and serum glutamate and GOT activity levels (Fig. 2). In fact, newborn infants with an Apgar score of <5 (severe fetal asphyxia) showed the highest serum glutamate and GOT levels.

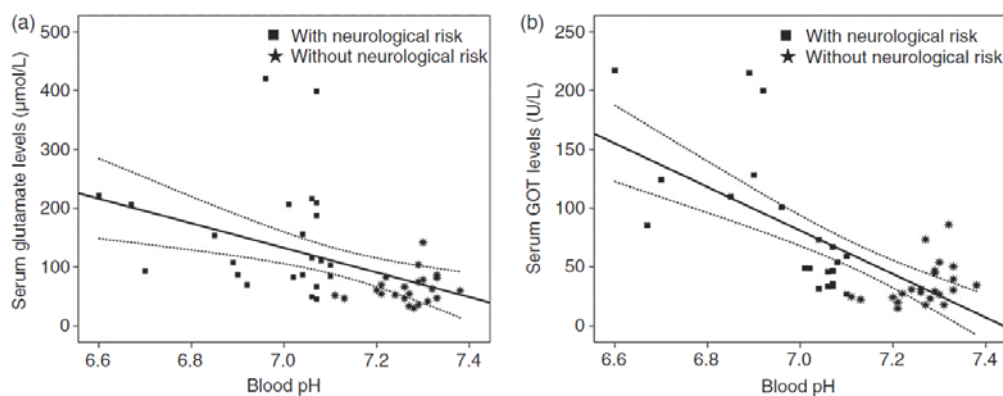


Figure 1: (a) Correlation between serum glutamate concentration and blood pH (Pearson's coefficient: -0.603 ; $p<0.001$). (b) Correlation between serum glutamate-oxaloacetate transaminase (GOT) activity and blood pH (Pearson's coefficient: -0.695 ; $p<0.001$). Square points denote newborn infants at risk of adverse neurological outcomes and asterisks denote newborn infants with no risk of adverse neurological outcomes. The solid and dashed lines show linear regressions together with their 95% confidence intervals.

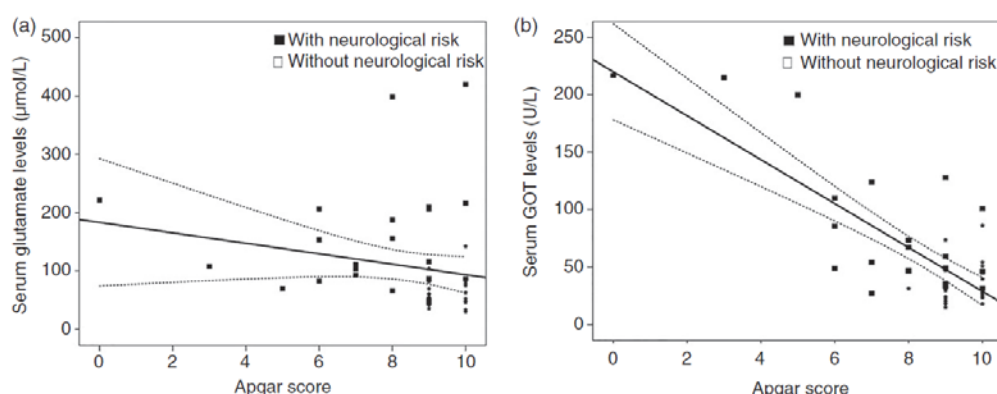


Figure 2: (a) Correlation between serum glutamate concentration and Apgar score (Pearson's coefficient: -0.392 ; $p=0.007$). (b) Correlation between glutamate-oxaloacetate transaminase (GOT) activity and Apgar score (Pearson's coefficient: -0.439 ; $p=0.003$). Square points denote newborn infants at risk of adverse neurological outcomes and asterisks denote newborn infants with no risk of adverse neurological outcomes. The solid and dashed lines show linear regressions together with their 95% confidence intervals.

Correlation between serum glutamate and GOT activity levels

Correlation analysis between serum glutamate concentration and GOT activity levels indicated that there was a positive correlation between both parameters ($r=0.403$; $p=0.006$) (Fig. 3).

Effect of serum glutamate and GOT activity levels on fetal hypoxic-ischaemic asphyxia

In the logistic regression analysis, serum glutamate levels were independently associated with hypoxic-ischaemic asphyxia (OR: 2.15; 95% CI: 1.06–4.36; $p=0.034$) after adjustment for sex, heart rate, and Apgar score (Table SI, online supporting information, Model A). In contrast, serum GOT activity levels were not independently associated with hypoxic-ischaemic asphyxia (OR: 1.05; 95% CI: 0.99–1.11; $p=0.052$) after adjusting for sex, heart rate, and Apgar score (Table SI, Model B).

DISCUSSION

In this study we have observed that fetal distress induces an increase in glutamate concentration in arterial blood sampled from umbilical cord, which is in line with the studies already reported.^{6,18} Analysis of Apgar scores and blood pH values (markers of perinatal distress) showed that conditions of severe distress (Apgar <5 and pH <7.0) was associated with higher glutamate levels. However, the main novelty of our findings is the positive correlation observed between glutamate concentrations and GOT enzymatic level. Similar to glutamate, higher GOT levels were observed in newborn infants with fetal distress, and conditions of severe distress (Apgar <5 and pH <7.0) were associated to higher GOT levels.

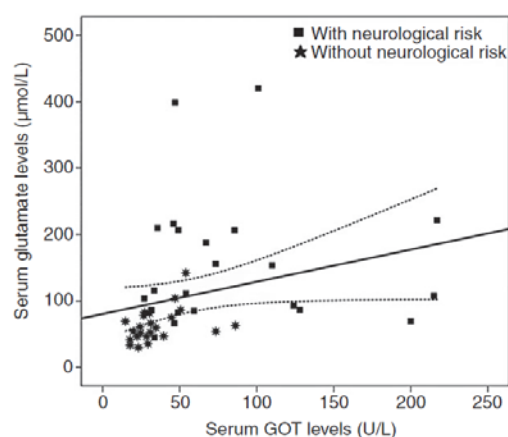


Figure 3: Correlation between serum glutamate concentration and glutamate-oxaloacetate transaminase (GOT) activity levels in newborn infants at risk and without risk of adverse neurological outcomes (Pearson's coefficient: 0.403 ; $p=0.006$). Square points denote newborn infants at risk of adverse neurological outcomes and asterisks denote newborn infants with no risk of adverse neurological outcomes. The solid and dashed lines show linear regressions together with their 95% confidence intervals.

The high expression of glutamate receptors in the immature brain makes this organ particularly susceptible to an increase in glutamate concentration. Therefore levels of this neurotransmitter must be strictly regulated during development,⁸ and processes such as fetal asphyxia represent an important risk for the newborn infant. Based on

the capacity of GOT to metabolize and reduce blood glutamate levels, the positive correlation between glutamate and GOT suggests that elevation of GOT activity during fetal development could act as an endogenous protective mechanism involved in the control of the adequate levels of blood glutamate with the aim to minimize the neurotoxic effect of this neurotransmitter.

It may be possible that the two processes are completely independent, that is, the increase in glutamate concentration is caused by neuronal damage whereas an increase in GOT concentration may be the result of the effect of asphyxia on systemic organs such as the liver or heart, as described in other studies.¹⁹ Although this explanation cannot be completely discarded, in our analysis we observed that GOT was not independently associated with fetal distress and only glutamate remained as an independent marker of perinatal distress. On the other hand, in a previous study it was observed that GOT in fetal blood was directly correlated with the concentration of serum glutamate in healthy newborn infants without any kind of neuronal or liver damage,¹³ which seems to confirm that GOT increase is mediated through glutamate release. An increase in the expression of GOT has also been observed in the brains of ischaemic animal models, where it was described that this enzyme can act as a pathway that may participate in the reduction of glutamate toxicity after neuronal ischaemic events.²⁰ The suggested protective role of GOT during development may be also supported by the fact that healthy newborn infants have higher GOT activity than adults. In this study we have observed that the average of GOT activity in healthy newborn infants was 34.9 SD 18.2 U/L, similar to that previously observed in other independent studies (39 SD 2 U/L¹³ and 23.46 SD 8 U/L),¹⁹ whereas levels of GOT in healthy adults was 18.7 SD 3.8 U/L²¹ and 19 SD 1 U/L in maternal blood.¹³

It's not surprising to find that immature brains have endogenous protective mechanisms against glutamate neurotoxicity. For example, experimental studies have reported that subcutaneous administration of glutamate in neonatal rats reduced the expression of some *N*-methyl-D-aspartate receptor subunits as an adaptive mechanism in order to minimize the toxic effects of high glutamate concentrations.¹⁰

The protective capacity of GOT to metabolize blood glutamate and reduce the concentration of glutamate in the brain has also been tested in other neuropathologies (e.g. stroke, traumatic brain injury, subarachnoid haemorrhage, or glioma), with successful results after its administration. In line with these results, we have found that stroke patients with good outcomes showed lower glutamate concentrations and higher GOT levels in the blood at admission.²¹ These findings showed a clear association between glutamate and GOT, presumably explained by the capacity of this enzyme to metabolize blood glutamate. In migraines, another neurobiological disorder associated with a dysregulation of brain glutamatergic homeostasis, we have reported that higher levels of glutamate and lower GOT

activity were observed in patients compared to unaffected control participants, which seems to indicate the involvement of the enzyme in the brain glutamate homeostasis in patients with migraines.²²

Homeostasis of brain glutamate is a highly energy-dependent process. Therefore conditions that affect the energy supply to the brain leads to a rapid build-up of excess glutamate in the brain that is rapidly reflected in an increase of blood glutamate concentration, as we have described in stroke.²³ We have also reported that surgical intervention that involves short periods of internal carotid occlusion and therefore temporal cerebral hypoxia (without ischaemic damage) causes an increase of blood glutamate levels in patients, showing that alterations of brain glutamate homeostasis start immediately after short periods of hypoxia, even without evidence of tissue damage.²⁴ In addition, an increase of blood glutamate was not observed in control patients (i.e. patients undergoing surgery but without internal carotid occlusion), which demonstrates that the brain is the source of glutamate release, being consistent with previous findings in stroke and other diseases of the central nervous system, both in serum and cerebrospinal fluid. Therefore, based on these previous findings, we consider that the increase of blood glutamate observed in newborn infants with hypoxic-ischaemic insult is produced by an alteration of brain glutamate homeostasis, which is subsequently reflected in blood concentration levels.

Regarding how changes in cerebral glutamate levels are reflected in blood glutamate levels, it has been widely described²⁵ that under normal conditions there is a unidirectional diffusion of glutamate from the brain to the blood mediated by capillary endothelial cells. This mechanism could explain why an increase of brain glutamate concentration is followed in an increase of blood glutamate concentration. On the other hand, one of the most critical consequences of brain hypoxia/ischemia is an alteration in the blood-brain barrier, which also allows the bidirectional diffusion of molecules between brain and blood. Finally, it is well accepted that the fetal blood-brain barrier has a higher permeability than an adult brain, which contributes in the diffusion of low-weight molecules (e.g. glutamate) from the cerebral parenchyma to the blood.

We identified two limitations in our study. First, we did not estimate the duration of fetal distress in each specific case, which potentially can affect to the levels of GOT and glutamate. However, patients with lower arterial pH (<7.00) and Apgar score (<5), and probably with longer fetal distress, showed higher glutamate levels. We therefore considered this parameter as a non-critical variable for the analysis. The second limitation of this study was that in the case of newborn infants with perinatal asphyxia, even with the increase in GOT activity, the high level of the enzyme was not able to avoid the increase of glutamate caused by asphyxia.

It is possible that the lack of a GOT system could result in a higher glutamate increase. In this regard, treatment

based on the administration of recombinant GOT could be a novel alternative therapy for newborn infants at risk of fetal asphyxia. Further experimental studies are necessary, with the aim to find out if GOT has a direct role in the control of glutamate homeostasis during development and to determine if GOT or other glutamate scavengers can be used as alternative therapeutic treatment after fetal asphyxia as described for stroke pathology.

In conclusion, we have observed that fetal distress caused an increase in glutamate concentrations in blood, which is positively correlated with higher levels of the GOT activity. The capacity of GOT to metabolize glutamate suggest that during fetal development, this enzyme can act as endogenous protective mechanisms involved in the control of glutamate homeostasis. Further experimental studies are necessary to better understand the protective role of GOT over brain development.

REFERENCES

1. Anidas JD, Yawo T, Sutherland AE, et al. Detecting brain injury in neonatal hypoxic ischemic encephalopathy: closing the gap between experimental and clinical research. *Exp Neurol* 2014; 261C: 281–90.
2. Bennet L, Tan S, Van den Heuvel L, et al. Cell therapy for neonatal hypoxia-ischemia and cerebral palsy. *Ann Neurol* 2012; 71: 589–600.
3. Robertson NJ, Nakakeeto M, Hagmann C, et al. Therapeutic hypothermia for birth asphyxia in low-resource settings: a pilot randomised controlled trial. *Lancet* 2008; 372: 801–3.
4. Fuchs SA, Peeters-Scholte CM, de Barse MM, et al. Increased concentrations of both NMDA receptor co-agonists d-serine and glycine in global ischemia: a potential novel treatment target for perinatal asphyxia. *Amino Acids* 2012; 43: 355–63.
5. Johnston MV. Excitotoxicity in neonatal hypoxia. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 2001; 7: 229–34.
6. Khashaba MT, Shouman BO, Shaltout AA, et al. Excitatory amino acids and magnesium sulfate in neonatal asphyxia. *Brain Dev* 2006; 28: 375–9.
7. Choudhury PR, Lahiri S, Rajamma U. Glutamate mediated signaling in the pathophysiology of autism spectrum disorders. *Pharmacol Biochem Behav* 2012; 100: 841–9.
8. Griesmaier E, Keller M. Glutamate receptors – prenatal insults, long-term consequences. *Pharmacol Biochem Behav* 2012; 100: 835–40.
9. Papazisis G, Pourzitaki C, Sardeli C, Lallas A, Amaniti E, Kouvelas D. Deferoxamine decreases the excitatory amino acid levels and improves the histological outcome in the hippocampus of neonatal rats after hypoxia-ischemia. *Pharmacol Res* 2008; 57: 73–8.
10. Rivera-Cervantes MC, Flores-Soto ME, Chaparro-Huerta V, et al. Changes in hippocampal NMDA-r subunit composition induced by exposure of neonatal rats to L-glutamate. *Int J Dev Neurosci* 2009; 27: 197–204.
11. Noorlander CW, de Graan PN, Nikkels PG, Schrama LH, Visser GH. Distribution of glutamate transporters in the human placenta. *Placenta* 2004; 25: 489–95.
12. Cetin I, de Santis MS, Tarico E, et al. Maternal and fetal amino acid concentrations in normal pregnancies and in pregnancies with gestational diabetes mellitus. *Am J Obstet Gynecol* 2005; 192: 610–7.
13. Zlotnik A, Tsesis S, Gruenbaum BF, et al. Relationship between glutamate, GOT and GPT levels in maternal and fetal blood: a potential mechanism for fetal neuroprotection. *Early Hum Dev* 2012; 88: 773–8.
14. Hagberg H. Hypoxic-ischemic damage in the neonatal brain: excitatory amino acids. *Dev Pharmacol Ther* 1992; 18: 139–44.
15. Murphy KM, Beston BR, Boley PM, Jones DG. Development of human visual cortex: a balance between excitatory and inhibitory plasticity mechanisms. *Dev Psychobiol* 2005; 46: 209–21.
16. Yeh P, Emary K, Impey L. The relationship between umbilical cord arterial pH and serious adverse neonatal outcome: analysis of 51,519 consecutive validated samples. *BJOG* 2012; 119: 824–31.
17. Malin GL, Morris RK, Khan KS. Strength of association between umbilical cord pH and perinatal and long term outcomes: systematic review and meta-analysis. *BMJ* 2010; 340: c1471.
18. Holopainen IE, Lauren HB. Glutamate signaling in the pathophysiology and therapy of prenatal insults. *Pharmacol Biochem Behav* 2012; 100: 825–34.
19. Islam MT, Islam MN, Mollah AH, et al. Status of liver enzymes in babies with perinatal asphyxia. *Mymensingh Med J* 2011; 20: 446–9.
20. Khanna S, Briggs Z, Rink C. Inducible glutamate oxaloacetate transaminase as a therapeutic target against ischemic stroke. *Antioxid Redox Signal* 2014; 22: 175–86.
21. Perez-Mato M, Ramos-Cabrera P, Sobrino T, et al. Human recombinant glutamate oxaloacetate transaminase 1 (got1) supplemented with oxaloacetate induces a protective effect after cerebral ischemia. *Cell Death Dis* 2014; 5: e992.
22. Campos F, Sobrino T, Perez-Mato M, et al. Glutamate oxaloacetate transaminase: a new key in the dysregulation of glutamate in migraine patients. *Cephalalgia* 2013; 33: 1148–54.
23. Campos F, Sobrino T, Ramos-Cabrera P, Castillo J. Oxaloacetate: a novel neuroprotective for acute ischemic stroke. *Int J Biochem Cell Biol* 2012; 44: 262–5.
24. Nombela F, Blanco M, Perez de la Ossa N, et al. Neuronal excitotoxicity after carotid angioplasty and stent placement procedures. *Radiology* 2013; 268: 515–20.
25. Cederberg HH, Uhd NC, Brodin B. Glutamate efflux at the blood-brain barrier: cellular mechanisms and potential clinical relevance. *Arch Med Res* 2014; 45: 639–45.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study has been partially supported by grants from Instituto de Salud Carlos III (PI13/00292 and PI11/00909), Spanish Research Network on Cerebrovascular Diseases RETICS-INVICTUS (RD12/0014). Furthermore, F. Campos (CP14/00154) and T. Sobrino (CP12/03121) are recipients of a research contract from Miguel Servet Program of Instituto de Salud Carlos III. The authors have stated that they had no interests that might be perceived as posing a conflict or bias.

SUPPORTING INFORMATION

The following additional material may be found online:

Appendix S1: Clinical and biochemical variables.

Table S1: Adjusted OR of serum glutamate concentration (Model A) and glutamate-oxaloacetate transaminase activity (Model B) for hypoxic-ischemic asphyxia.

REFERENCES

1. Ozel S, Switzer L, Macintosh A, Fehlings D. Informing evidence-based clinical practice guidelines for children with cerebral palsy at risk of osteoporosis: an update. *Dev Med Child Neurol* 2016; 58: 918–23.
2. Trinh A, Wong P, Fahey MC, et al. Musculoskeletal and endocrine health in adults with cerebral palsy: new opportunities for intervention. *J Clin Endocrinol Metab* 2016; 101: 1190–97.
3. Worley G, Houlihan CM, Herman-Giddens ME, et al. Secondary sexual characteristics in children with cerebral palsy and moderate to severe motor impairment: a cross-sectional survey. *Pediatrics* 2002; 110: 897–902.
4. Fowler EG, Rao S, Nattiv A, Heberer K, Oppenheim WL. Bone density in premenopausal women and men under 50 years of age with cerebral palsy. *Arch Phys Med Rehabil* 2015; 96: 1304–09.
5. Marciniak C, Gabet J, Lee J, Ma M, Brander K, Wysocki N. Osteoporosis in adults with cerebral palsy: feasibility of DXA screening and risk factors for low bone density. *Osteoporos Int* 2016; 27: 1477–84.

Hepatic damage and glutamate oxaloacetate transaminase elevations during fetal asphyxia

Alicia Iglesias-Deus^{1*}, Francisco Campos^{2*},
Clara Correa-Paz², Tomás Sobrino²,
José María Fraga¹, José Castillo², María-Luz Couce¹

¹ Neonatology Unit, Department of Pediatrics, Clinical University Hospital of Santiago de Compostela, Health Research Institute of Santiago de Compostela (IDIS), Santiago de Compostela; ² Clinical Neurosciences Research Laboratory, Clinical University Hospital of Santiago de Compostela, Health Research Institute of Santiago de Compostela (IDIS), Universidade de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain.

Correspondence to Francisco Campos at Clinical University Hospital, Universidade de Santiago de Compostela, Spain. E-mail: francisco.campos.perez@sergas.es

*These authors contributed equally to this work.

doi: 10.1111/dmcn.13310

Perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy (HIE) (also known as fetal asphyxia) is a major cause of brain injury in newborn infants. It can result in devastating short and long-term consequences, causing death or permanent neurological disability.

It has been well established that, among the different biochemical mechanisms that can damage the neuronal tissue after fetal asphyxia, the release of excessive amounts of glutamate into the cerebral extracellular space plays a central role in the pathology.¹

In a previous study, we described how fetal distress caused an increase in glutamate concentrations in blood that was positively correlated with higher levels of glutamate oxaloacetate transaminase (GOT) activity. Due to the capacity of GOT to metabolize glutamate, it was suggested that during fetal development this enzyme could act as an endogenous protective mechanism involved in the control of glutamate homeostasis.²

However, in addition to acute encephalopathy, severe birth asphyxia may induce variable damage in other peripheral organs, such as the hepatic system, which could lead the transient increase of GOT and other serum enzymes, such as glutamate pyruvate transaminase (GPT) or gamma

glutamyl transferase (GGT).³ Therefore, it can tentatively be postulated that the increase in GOT previously described in HIE² could be the result of the effect of asphyxia on systemic organs, and not due to endogenous protective mechanisms acting against glutamate excitotoxicity.

In order to strengthen this theory, we analyzed the levels of GPT and GGT as the most specific markers of hepatic damage, and creatine kinase (CK) as a marker of muscle or cardiac damage, in the same serum samples from newborn infants previously included in the GOT study.²

In line with our previous study,² GOT activity from umbilical blood samples was significantly higher in newborn infants with fetal asphyxia than in the control group; however, analysis of GPT activity levels showed no significant differences between the two groups (Fig. 1 and Table S1, online supplementary information). Also, we did not find a significant association between serum glutamate and GPT activity levels (Fig. S1, online supporting information). Similar results were also observed for GGT and CK (statistical analysis described in Appendix S1, online supporting information).

In this new study, levels of GPT, used as the most specific serum marker of liver injury, confirmed the absence of hepatic damage in the newborn infants, which corroborates our GOT-protective hypothesis against glutamate excitotoxicity.

Many pediatric studies refer to elevated GPT levels, often twice the upper limit of normal; for children younger than 18 months of age, a recent European study used a cut-off for elevated GPT of 60 U/L for boys and 55 U/L for girls.⁴ In our cohort, we have not found statistically significant differences in GPT activity levels among patients with pH of 7.1 or below. In fact none of our patients exceeds two times the upper limit, mentioned above, considered normal. In addition, Shellhaas et al.⁵ classified liver function as definitely abnormal in infants with liver enzyme levels at or greater than 300% of normal, with normal defined as 7 to 35 U/L. For GPT, the

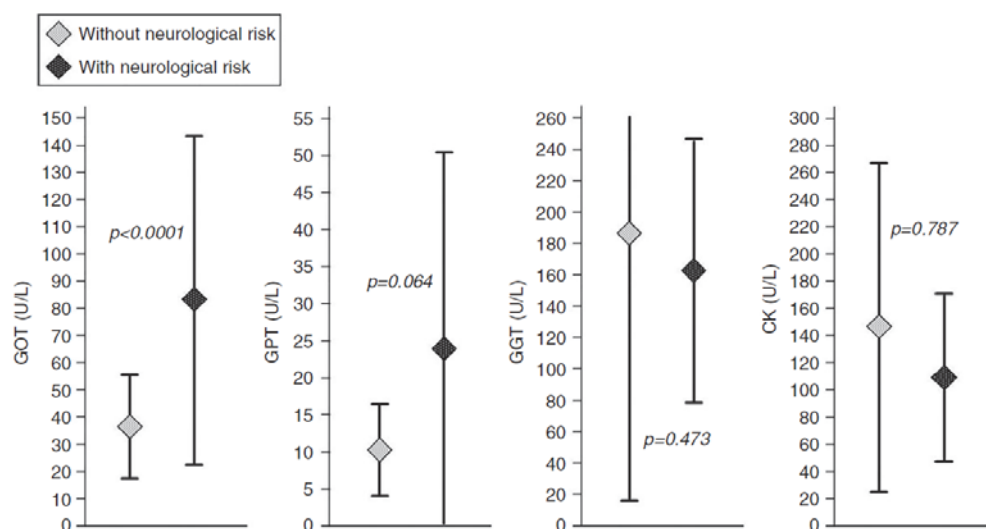


Figure 1: Comparative analysis of glutamate oxaloacetate transaminase (GOT), glutamate pyruvate transaminase (GPT), gamma glutamyl transferase (GGT), and creatine kinase (CK) between newborns with risk and without risk of adverse neurological outcomes.

mean level of our cases (24.3 U/L) did not exceed the upper limit considered normal, given that elevated GOT can be justified by hypoxic hepatitis.

Levels of other hepatic and systemic damage markers, GGT and CK, were also similar in both groups studied. In any case, activity levels did not exceed two times the upper limit considered normal, which confirms the lack of systemic damage in our cohort of newborn infants at risk of adverse neurological outcomes.

In summary, this new analysis and data support the previous hypothesis about the role of the GOT enzyme as an endogenous protective mechanism against neurotoxicity mediated by glutamate. It may represent also a new therapeutic target for use alone or in combination with other strategies.

ACKNOWLEDGEMENTS

This project has been partially supported by grants from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (SAF2014-56336), Instituto de Salud Carlos III (PI13/00292; PI14/01879),

the Spanish Research Network on Cerebrovascular Diseases RETICS-INVICTUS (RD12/0014), Xunta de Galicia (Consejería Educación GRC2014/027), and the European Union program FEDER. Finally, FC (CP14/00154) and TS (CP12/03121) are recipients of a research contract from Miguel Servet Program of Instituto de Salud Carlos III.

SUPPORTING INFORMATION

The following additional material may be found online:

Appendix S1: Statistical analysis.

Table S1: Baseline clinical characteristics and laboratory parameters of newborn infants at risk of adverse neurological outcomes ($pH \leq 7.1$ in umbilical cord arterial blood) and control participants with no risk of adverse neurological outcomes.

Figure S1: Correlation between serum glutamate concentration and GOT, GPT, GGT and CK activity levels in newborn infants newborns with risk and without risk of adverse neurological outcomes.

REFERENCES

1. Khashaba MT, Shouman BO, Shaltout AA, et al. Excitatory amino acids and magnesium sulfate in neonatal asphyxia. *Brain Dev* 2006; 28: 375–79.
2. Pérez-Mato M, Iglesias-Deus A, Rujido S, et al. Potential protective role of endogenous glutamate-oxaloacetate transaminase against glutamate excitotoxicity in fetal hypoxic-ischaemic asphyxia. *Dev Med Child Neurol* 2016; 58: 57–62.
3. Islam MT, Islam MN, Mollah AH, et al. Status of liver enzymes in babies with perinatal asphyxia. *Mymensingh Med J* 2011; 20: 446–49.
4. England K, Thorne C, Pembrey L, et al. Age- and sex-related reference ranges of alanine aminotransferase levels in children: European paediatric HCV network. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2009; 49: 71–77.
5. Shellhaas RA, Kushwaha JS, Plegue MA, et al. An evaluation of cerebral and systemic predictors of 18-month outcomes for neonates with hypoxic ischemic encephalopathy. *J Child Neurol* 2015; 30: 1526–31.

